

# Chronobiologie von *Clusia minor*: circadianer Rhythmus in einer Pflanze mit C<sub>3</sub>/CAM- intermediärem photosynthetischen Verhalten

Dem Fachbereich der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines

*Doktor rerum naturalium*

genehmigte

Dissertation von

**Heitor Monteiro Duarte**

aus

Goiânia / Goiás, Brasilien

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Lüttge

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Heber

Tag der Einreichung: 02.12.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2006

Darmstadt 2005

D17

## DANKSAGUNG

Während meiner Arbeit als Doktorand und Mitarbeiter am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt wurde ich von Freunden, Kollegen und verschiedenen Institutionen vielfältig unterstützt. Ohne diese Unterstützung wäre die hier vorgelegte Dissertation nicht zustande gekommen. Und so danke ich allen, die meine Arbeit gefördert haben, sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Lüttge. Er hat mir das interessante Thema überlassen, hat die Arbeit wissenschaftlich betreut, und er hat sie mit seiner steten Bereitschaft zu intensiver Diskussion, seiner Geduld und seiner immer wieder motivierenden Begeisterung mich wesentlich gefördert. Ich danke ihm auch, dass er mir viele Möglichkeiten zur Kollaboration mit deutschen, brasilianischen und polnischen Wissenschaftlern eröffnet und mir Forschungsaufenthalte in Brasilien und Polen ermöglicht hat.

Prof. Dr. C. B. Osmond und Prof. Dr. U. Heber danke ich für sehr wichtige Diskussionen und Anregungen im Zusammenhang mit den Untersuchungen über Photorespiration. Dr. Th. Wyka und Dr. A. Bohn für die Diskussionen zum Thema Endogener Rhythmus und CAM, Prof. Dr. Th. M. Hütt und R. Neff für wertvolle Hilfe bei der Anwendung mathematischer Algorithmen.

Prof. Dr. Eduardo Arcoverde de Mattos, Dr. U. Rascher und Frau R. Schümann danke ich für Hilfe bei den Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz. Prof. Dr. Ziska und Frau R. Duque-Thüs (Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) haben mir dankenswerter Weise bei Einbettung von Blattgewebe in Methacrylat geholfen.

Sehr zu danken habe ich den Herren K. Schuller, U. Pelger, A. Reinhardt und den Mitarbeitern der Institutswerkstatt für die unentbehrliche technische Unterstützung bei der Wartung von Geräten, der Entwicklung des „Oxymat“, des „Fluoromat“ und der „Stochastischen Lichtquelle“. Karl Schuller danke ich außerdem für die von Anfang an unvergessliche freundliche Verbundenheit im Institut und für seine Partnerschaft beim Fußballspielen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für ein dreijähriges Forschungsstipendium und dem DFG-Graduiertenkolleg 340 (*Communication in biological systems*:

*from the molecule to the organism in its environment*) für wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung bei einigen Aspekten der Arbeit.

Prof. Dr. U. Lüttge, Prof. Dr. M. Kluge, Dr. M. Liebig, Dr. N. Uehlein und Frau Barbara Reinhardt gebührt herzlicher Dank für Korrekturen und Vorschläge bei der Abfassung der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Mitarbeitern und Kollegen, besonderes aber bei Herrn K. Blümmer, Dr. E. Fischer-Schliebs, Dr. Kramer, Frau D. Schäfer, Frau R. Brandtner, Frau S. Lenz und Frau L. Christian für die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe bedanken.

Meine Familie hat meine Arbeit aus der Ferne und Viviana aus der Nähe unterstützt, und sie haben mir dadurch immer wieder den Rücken gestärkt. Dafür mein warmer Dank! .

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Der circadiane Rhythmus	1
1.2	Der Crassulaceen Säurestoffwechsel – CAM	2
1.3	Der CAM als circadianer Rhythmus	2
1.4	Das CAM-Modell	3
1.5	Ein CAM Blatt als eine Ansammlung multipler Oszillatoren	5
1.6	Die C <sub>3</sub> -Photosynthese zeigt circadiane Oszillationen	6
1.7	<i>Clusia minor</i> – ein Modell zur Untersuchung der Rhythmik im C <sub>3</sub> - und CAM-Zustand	7
1.8	Praktische Ziele	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	Pflanzen: <i>Clusia minor</i> L.	11
2.2	Messung des pflanzlichen Gaswechsels	12
2.2.1	Messsystem	12
2.2.2	Berechnung der Gaswechseldaten	13
2.2.2.1	Netto-CO <sub>2</sub> -Austauschrate	13
2.2.2.2	Transpirationsrate	14
2.2.2.3	Wasserdampfdruck-Differenz	14
2.2.2.4	Blattleitfähigkeit für Wasserdampf	15
2.2.2.5	CO <sub>2</sub> -Partialdruck im Blattgewebe	15
2.3	Chlorophyllfluoreszenz	15
2.3.1	Theoretische Grundlagen der Chlorophyllfluoreszenz-Messungen	15
2.3.2	Messsystem 1: PAM 101/102/103	17
2.3.3	Berechnung der Chlorophyllfluoreszenz-Parameter	17
2.3.4	Messsystem 2: Die Chlorophyllfluoreszenz-Kamera	18
2.3.5	Berechnung der Chlorophyllfluoreszenz Parameter	19
2.3.5.1	Relative Quanteneffizienz des Elektrontransportes (rel. $\phi_{PSII}$ )	19
2.3.5.2	Mathematische Quantifizierung der räumlichen Struktur der Chlorophyllfluoreszenz Bilder – das Heterogenitätsmaß	20
2.4	Bestimmung der photorespiratorischen Aktivität	21
2.4.1	Messsystem	21
2.4.2	Berechnung der photorespiratorischen Aktivität	21
2.5	Analyse der organischen Säuren	23
2.5.1	Probenahme und Aufbereitung der Proben	23
2.5.2	Bestimmung des Malatgehaltes	24
2.5.3	Bestimmung des Citratgehaltes	25

---

2.6	Anatomische Untersuchungen: Einbettung und Mikroskopie des Blattmaterials	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
3.1	Die Adaptation der Pflanzen zum C <sub>3</sub> - oder CAM-Zustand.	28
3.2	Analyse von Tagesgängen in <i>C. minor</i> im normalen täglichen Licht-/Dunkel-Rhythmus	29
3.2.1	Tag/Nacht Rhythmus in C <sub>3</sub> - und CAM- adaptierten <i>C. minor</i> -Pflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen	30
3.2.2	Zeit-räumliche Dynamik des Tagesverlaufes von C <sub>3</sub> - und CAM- adaptierten Pflanzen von <i>C. minor</i> bei 25°C	34
3.2.3	Photorespiratorische Aktivität in C <sub>3</sub> - und CAM- adaptierten Pflanzen	40
3.3	Analyse des endogenen Rhythmus im Dauerlicht	47
3.3.1	Einfluss der Temperatur auf den endogenen Photosynthese-Rhythmus in <i>C. minor</i> .	47
3.3.2	Endogener Rhythmus bei 25°C in C <sub>3</sub> - und CAM- adaptierten Pflanzen im Detail	50
3.3.3	Die Beobachtung des endogenen Rhythmus bei <i>C. minor</i> mit Applikation von Luft mit 1% O <sub>2</sub>	54
3.4	Blattanatomie von <i>C. minor</i>	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
4.1	Teil 1. Adaptation und Analyse von Tagesgängen	66
4.2	Teil 2: Analyse des endogenen Rhythmus im Dauerlicht	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>96</b>
7.1	Quellcode der Steuerprogramme der Fluoreszenz-Kamera und des „Oxymats“	96
7.1.1	Initialisierung der Fluoreszenz-Kamera („Init.cmd“)	98
7.1.2	Zeitsteuerung für die Fluoreszenz Kamera und den „Oxymat“	99
7.1.3	Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern unter 1% O <sub>2</sub>	100
7.1.4	Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern unter normaler Luft	102
7.1.5	Quellcode zur Berechnung der relativen Quanteneffizienz	102
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>104</b>

## ABKÜRZUNGEN

$A_B$	Blattfläche
ATP	Adenosintriphosphat
CAM	Crassulaceen - Säurestoffwechsel ("crassulacean acid metabolism")
$p^a_{CO_2}$	CO <sub>2</sub> -Konzentration in der Umgebung [Pa]
$p^i_{CO_2}$	CO <sub>2</sub> -Konzentration im Blattgewebe [Pa]
Chl	Chlorophyll
$\Delta CO_2$	Differenz der CO <sub>2</sub> -Konzentrationen zwischen Mess- und Vergleichsgas [ppm]
$\Delta H_2O$	Differenz der H <sub>2</sub> O-Konzentrationen zwischen Mess- und Vergleichsgas [ppm]
F	Grundfluoreszenz des licht-adaptierten Blattes (PAM Messung) [rel.]
$F_m'$	maximale Fluoreszenz des licht-adaptierten Blattes (PAM Messung) [rel.]
$\Delta F/F_m'$	effektive Quanteneffizienz des Photosystems II ( $\Delta F = F_m' - F$ ) (PAM Messung)
$f_{CO_2}$	CO <sub>2</sub> -Empfindlichkeitsfaktor des Infrarot-Gasanalytators bei einer CO <sub>2</sub> -Konzentration von 360 ppm
$f_{H_2O}$	H <sub>2</sub> O- Empfindlichkeitsfaktor des Infrarot-Gasanalytators
$flow$	Strömungsgeschwindigkeit des Mess- und Vergleichsgasstroms [m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ]
rel. $\phi_{PSII}$	relative Quanteneffizienz des Photosystems II (Messung mittels Fluoreszenz-Kamera)
$g_{H_2O}$	Blattleitfähigkeit für Wasserdampf [mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
HIGH-Bild	Fluoreszenz-Bild während es sättigenden Lichtpulses
$J_{CO_2}$	Netto CO <sub>2</sub> -Austauschrate [μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
$J_{CO_2 \max}$	maximale Carboxylierungsrate unter die Applikation von Luft mit 1% O <sub>2</sub>
$J_{H_2O}$	Transpirationsrate [mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]
$J_{O_2}$	Photorespirationsrate
% $J_{O_2}$	prozentuale photorespiratorische Aktivität
$\lambda$	Wellenlänge
LOW-Bild	Fluoreszenz-Bild bei normalen Lichtbedingungen
LUT	Zuordnung von Intensitäten in Falschfarben („look up table“)
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat
$P_0$	Luftdruck unter Standardbedingungen [101,3 kPa]
$P_1$	Luftdruck unter Versuchsbedingungen [kPa]
PAM	patentiertes Chlorophyllfluoreszenz-Messverfahren ("pulse amplitude modulation")
PEP	Phosphoenolpyruvat

---

PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PPFD	photosynthetisch aktive Photonenflussdichte ( $\lambda = 400\text{--}700\text{ nm}$ ) [ $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ]
ppm	<i>engl. parts per million</i>
PS	Photosystem
$P_{wBl}$	Wasserdampfpartialdruck im Blattinneren [ $\text{mbar bar}^{-1}$ ]
$P_{wK}$	Wasserdampfpartialdruck in der Küvette [ $\text{mbar bar}^{-1}$ ]
$Q_A$	Plastochinon A (Elektronen-Erstakzeptor des Photosystems II)
$r$	Korrelationskoeffizient
RH	relative Luftfeuchte ("relative humidity") [%]
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
$S_0$	Grundzustand der Elektronen des Chlorophylls
$S_1$	erster angeregter Zustand der Elektronen des Chlorophylls
$T_0$	Temperatur unter Versuchsbedingungen [K]
$T_1$	Temperatur unter Standardbedingungen [K]
VPD	Wasserdampfdruck-Differenz („vapour pressure difference“) [ $\text{mbar bar}^{-1}$ ]
YIELD-Bild	Bild der relativen Quanteneffizienz des PSII (rel. $\phi_{PSII}$ )

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Der circadiane Rhythmus

Es gibt Beweise, dass Lebewesen den Erdplaneten seit mindestens 3,8 Milliarden Jahren (MJ) besiedeln (Mojzsis *et al.*, 1996). Die ersten photosynthetisch aktiven Organismen haben sich vor 3,4 MJ in der euphotischen Schicht der Ozeane entwickelt (Tice & Lowe, 2004). Seitdem erleben die Organismen rhythmische irdische Zeitstrukturen wie den Gezeitenzyklus (12,5 Std.), den Tag-Nacht-Zyklus (24 Std.), den Mondzyklus (28,5 Tage) und den Jahreszyklus (365,25 Tage). Eine Adaptation von Organismen an den Tag-Nacht-Zyklus, der durch die Rotation der Erde und die Sonnenstrahlung erzeugt wird, produzierte eine biologische Zeitstruktur, die unter konstanten Bedingungen weiter oszillieren kann. Dies wird *circadianer Rhythmus* (*circa* (lat.): ungefähr; *dies* (lat.): Tag) genannt und wurde schon in verschiedenen Aspekten der Physiologie von Lebewesen beobachtet.

Besonders in Pflanzen wurde die Erscheinung seit dem 18. Jahrhundert experimentell untersucht. Der Pariser Astronom De Mairan (1729) erkannte, dass sich die Bewegungen der Pflanzen auch bei ununterbrochener Dunkelheit (Dauerdunkel) fortsetzen, und 30 Jahre später fand der Hamburger J. G. Zinn, dass sich die Blätter der Bohne (*Phaseolus coccineus*) auch ohne einen Licht-Dunkel-Stimulus heben und senken und dass die Bewegungen weitgehend temperaturunabhängig sind. Carl von Linné beobachtete, dass das Öffnen und Schließen der Blüten artspezifisch zu bestimmten Tageszeiten erfolgt (Blumenuhr, dargestellt 1755 im *Horologium flore confirmandum*, zitiert nach E. Bünning, 1953). Freilaufende Rhythmen im Dauerlicht oder Dauerdunkel der nyktinastischen Schlafbewegungen von Blättern wurden von W. Pfeffer (1907) am Anfang des 20. Jahrhunderts gezeigt, und dadurch wurde die Bedeutung der Autonomie der circadianen Rhythmik erkannt. Weitere Forschungen zur Bewegung von Pflanzen wurden an *Phaseolus multiflorus* (Blattbewegung, Bünning & Tazawa, 1957) und an *Kalanchoë blossfeldiana* (Blütenblattbewegung, Bünsow 1953) durchgeführt. Circadiane Rhythmik wurde auch in der Biolumineszenz von *Gonyaulax polyedra* (Hastings & Sweeney 1960, Roenneberg & Morse 1994) und im Crassulaceen-Säurestoffwechsel (CAM – *Crassulacean Acid Metabolism*) (Lüttge & Ball 1978, Warren & Wilkins 1961) beobachtet. In den meisten Fällen hatten die Untersuchungen phänomenologischen Charakter.



## 1.2 Der Crassulaceen Säurestoffwechsel – CAM

Beim Crassulaceen-Säurestoffwechsel (CAM) liegt eine circadiane Zeitstruktur insbesondere in der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme und der stomatären Leitfähigkeit vor (Lüttge und Ball, 1978). CAM ist ein Photosynthesemodus, dessen wichtigste Eigenschaft die zeitliche Trennung zwischen der Aufnahme von  $\text{CO}_2$  und seiner Fixierung durch die Ribulose-1,5-*bis*phosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) im Calvin- Zyklus ist. In der Nacht wird das atmosphärische und/oder respiratorische  $\text{CO}_2$  in Form von cytoplasmatischem  $\text{HCO}_3^-$  durch die Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) fixiert. Das nach Reduktion des gebildeten Oxalacetates produzierte Malat wird dann durch spezifische Kanäle und energetisiert durch die V-ATPase aktiv in die Vakuole transportiert. Während des Tages wird das in der Nacht akkumulierte Malat (Äpfelsäure) im Cytoplasma durch die Aktivität des Malatenzyms (ME) decarboxyliert. Das entstehende  $\text{CO}_2$  wird dann im photosynthetischen  $\text{C}_3$ -Zyklus durch die Aktivität der RUBISCO wieder fixiert.

Nach Osmond (1978) entspricht die nächtliche  $\text{CO}_2$ -Fixierung der ersten von insgesamt vier Phasen des CAM (Phase I). Am Anfang der Lichtphase, in der Phase II, wird die RUBISCO aktiviert und die PEPC deaktiviert. Eine schnelle Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Austauschrate ist für diese Übergangsphase charakteristisch. Sie wird jedoch wieder niedrig, wenn sich die Stomata in Reaktion auf die Erhöhung der internen  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe durch den Beginn der Malatmobilisierung schließen. Dies ist der Anfang der Phase III, deren Dauer von der Menge nächtlich akkumulierten Malats, das die  $\text{C}_3$ -Photosynthese versorgt, abhängt. Der  $\text{CO}_2$ -Austausch kann hier wegen des Verlusts von internem  $\text{CO}_2$  sogar leicht negativ sein. Die Phase IV beginnt, wenn die interne  $\text{CO}_2$ -Konzentration abnimmt. Dann öffnen sich die Stomata wieder, und atmosphärisches  $\text{CO}_2$  kann direkt durch die RUBISCO-Aktivität fixiert werden.

## 1.3 Der CAM als circadianer Rhythmus

Das circadiane Verhalten des CAM ist schon seit mehr als 45 Jahren bekannt. Die endogene Gaswechselrhythmik wurde erst im Dauerdunkel und in  $\text{CO}_2$ -freier Luft (Wilkins 1959) und später im Dauerlicht und in normaler Luft (Nuernbergk 1961, Lüttge & Ball, 1978, Wilkins 1984) beobachtet. Der Rhythmus im Malatgehalt wurde zuerst von Buchanan-Bollig & Smith (1984) festgestellt.

Die Fixierung von  $\text{CO}_2$  durch das allosterische Enzym PEPC ist ein wichtiger Teil der Rhythmik des CAM. PEPC wird durch Malat und Glucose-6-phosphat (Andreo *et al.*, 1990) gehemmt. Darüber hinaus wird die Sensibilität dieses Enzyms für Malat durch reversible Phosphorylierung durch die PEPC-Kinase (PPCK) kontrolliert. Die unphosphorylierte Form der PEPC hat eine höhere Sensitivität für Malat und liegt am Tag wegen des hohen cytoplasmatischen Malatsgehalts gehemmt vor (Kluge *et al.* 1981; Nimmo *et al.* 1984, 1986, 2000). Die gleichzeitige Aktivität von PEPC und RUBISCO wird dann durch die Kontrolle über PPCK besonders während der Phase III vermieden, und dies ermöglicht eine vollständige  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch die RUBISCO. Jedoch wurde eine Aktivität der PEPC in den Phasen II und IV in *Clusia minor* und *Clusia fluminensis* (Borland & Griffiths, 1997; Roberts *et al.*, 1996, 1997) und in Phase IV in *K. daigremontiana* (Borland & Griffiths, 1997) beobachtet. Der Phosphorylierungszustand der PEPC ist dann durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der PPCK kontrolliert, deren Expression jedoch durch einen circadianen Oszillator auf der Ebene der Genexpression gesteuert ist (Carter *et al.*, 1991; Hartwell *et al.*, 1996, 1999; Taiby *et al.*, 2000). Andererseits bewiesen experimentelle Untersuchungen, dass die Aktivität und Expression der PPCK unter der Kontrolle von cytoplasmatischem Malat oder verwandten Metaboliten steht (Borland & Taybi, 2004, Borland *et al.*, 1999 Hartwell *et al.*, 1999). Nimmo (2000) schlug vor, dass die circadiane Kontrolle der PPCK-Genexpression eine sekundäre Antwort auf den Malattransport durch die Membran des Tonoplasten ist. Diese Information wurde aber erst durch die theoretische Modellierung und Computersimulationen des CAM, mit besonderer Betrachtung des Verhaltens der Tonoplastmembran erhalten. Änderungen der osmotischen Kapazität der Vakuole koordinieren durch mechanische Spannung und Entspannung des Tonoplasten das Ausfließen des Malats ins Cytoplasma. Die Tonoplastmembran ist dann als der „Master Switch“ der circadianen Steuerung CAM zu betrachten (Lüttge 2000, 2000a).

## 1.4 Das CAM-Modell

Beweise für die metabolische Kontrolle des endogenen Rhythmus des CAM kommen von der engen Verknüpfung von Experiment und physikalischer Modellierung dieses Stoffwechsels. Die erste Simulation des CAM bediente sich gekoppelter nicht linearer Differenzialgleichungen, um die die Änderungen der Konzentration von sechs der wichtigsten Metaboliten des CAM-Zyklus ( $\text{CO}_2$ , Kohlenhydrate, Glucose-6-phosphat, Phosphoenolpyruvat, cytoplasmatisches und vakuoläres Malat) zu beschreiben (Nungesser *et al.*, 1984). Der unabhängige Parameter war die Lichtintensität, die den

Malat-Ausfluss durch die Tonoplastenmembran regelt. Das Modell reproduzierte die Tag/Nacht-Fluktuationen der Metaboliten, war aber nicht erfolgreich, lang andauernde Schwingungen im Dauerlicht zu simulieren. Lüttge & Smith (1984) schlugen vor, dass in der Phase III das Ausfließen des Malats aus der Vakuole durch die Diffusion seiner undissoziierten Form (Äpfelsäure:  $H_2$ -Malat) durch die Lipidphase der Tonoplastmembran geschieht. Lüttge & Beck (1992) modifizierten dann die Malat Einfluss/Ausfluss-Funktion des Nungesser Modells durch eine *hysteresis switch*-Funktion und konnten robuste Simulationen des endogenen Rhythmus im Dauerlicht durchführen. Der „*hysteresis switch*“ wechselte abhängig vom Malatgehalt der Vakuole zwischen zwei stabilen Zuständen: aktiver Einfluss von Malat in die Vakuole und sein passiver Ausfluss wieder ins Cytoplasma. Parallele Messungen der Netto- $CO_2$ -Aufnahme unter unterschiedlichen Lichtintensitäten und Temperaturen bewiesen die Fähigkeit des Modells, lang andauernde Schwingungen zu simulieren. In diesem Stadium band das Modell die Temperatur nicht als externen Parameter ein. Grams *et al.* (1996, 1997) zeigten experimentell den Effekt der Temperatur auf den endogenen Rhythmus und den Malatgehalt des Vakuole. Bei Temperaturen niedriger als  $18^\circ C$  hielt der Rhythmus mit Malat-gefüllter Vakuole an, und bei Temperaturen höher als  $28^\circ C$  hielt der Rhythmus mit leerer Vakuole an. Außerdem waren die Übergänge zwischen stabilem und rhythmischem Zustand reversibel. Durch die Diskriminierung von  $^{12/13}C$  wurde von Grams *et al.* (1996) auch die Aktivität der PEPC im endogenen Rhythmus gemessen. Die Aktivität dieses Enzyms steigt beim Wechsel von hoher und niedriger Temperatur. Dies wies auf die Abhängigkeit des Ein- und Ausflusses von Malat vom Organisationszustand der Tonoplastmembran hin, die im Endeffekt auch die Aktivität der PEPC beeinflusst. Diese Prozesse wurden in dem Modell zuerst durch einen diskreten „*matrix-switch*“ (Grams *et al.* 1996) und danach durch eine kontinuierliche Abhängigkeit der Tonoplastmembran von der Temperatur (Blasius 1998) modifiziert. Die Metabolitenpools in dem CAM-Modell wurden von Blasius (1997, 1998) auch von sechs auf drei ( $CO_2$ , cytoplasmatisches Malat und vakuoläres Malat) reduziert, die den wichtigen Kohlenstofffluss im circadianen CAM-Rhythmus repräsentieren. Das reduzierte Modell war noch robuster und ermöglichte es, die Temperaturabhängigkeit der Zerstörung des Rhythmus bei hohen und niedrigen Temperaturen (Buchanan-Bollig, 1984; Lüttge & Beck, 1992) zu reproduzieren.

Der Organisationszustand der C-Kette der Lipidmoleküle beeinflusst die Permeabilität der Tonoplastenmembran (Friemert *et al.*, 1988; Kliemchen *et al.*, 1993) und kann das vakuoläre Ausfließen des Malats regulieren. In dieser Richtung wurde das Membranmodell von Jähnig (1977, 1979) von Neff *et al.* (1998) benutzt, um den quantitativen Organisationszustand der Tonoplastmembran thermodynamisch zu untersuchen. Die Autoren fanden einen bistabilen Organisationszustand der Lipidschicht, der durch Temperatur und die mechanische

Membranspannung an den Zellturgor gekoppelt war. Blasius (1998b) nutzte das Modell von Neff *et al.* (1998), um ein autonomes dynamisches Modell des CAM zu konstruieren, das den Effekt der Temperatur auf den circadianen Rhythmus sehr gut repräsentiert. Zusätzlich kann der CAM als circadianer Rhythmus von externen Umgebungsfaktoren mitgenommen werden (*entrainment*), was für die Temperatur (Lüttge *et al.* 1996; Bohn *et al.* 2002; Hütt *et al.*, 2002) und das Licht (Bohn *et al.* 2001) beobachtet wurde.

## 1.5 Ein CAM Blatt als eine Ansammlung multipler Oszillatoren

Beweise für die Existenz multipler Oszillatoren kommen von Versuchen, die unterschiedliche physiologische Rhythmen entkoppeln. Die stomatäre Leitfähigkeit und die Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme können z. B. in *Phaseolus vulgaris* L. unter bestimmten Bedingungen entkoppelt werden (Hennessey & Field, 1992). Auch isolierte Pflanzengewebe zeigen circadiane Rhythmik, wie der stomatären Bewegung und bei Protoplasten aus Pulvini (Gorton *et al.*, 1989; Mayer *et al.*, 1997).

Im Falle des CAM läuft der gesamte Zyklus innerhalb einer einzigen Zelle ab, die einen individuellen Oszillator enthalten muß. In diesem Sinne integriert die Messung der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme eines ganzen Blattes eine große Zahl von gleichen gekoppelten individuellen CAM-Oszillatoren. Maxwell *et al.* (1997) zeigten, dass zwischen den Zellen in Blättern von *K. daigremontiana* ein großer Diffusionswiderstand besteht. Das bedeutet eine schwache Kopplung zwischen individuellen CAM-Oszillatoren. Die Rückkehr vom arrhythmischen Verhalten unter hoher Temperatur zum rhythmischen Verhalten bei niedriger Temperatur erfolgt nicht, wenn der Temperaturwechsel langsam ist (Rascher *et al.*, 1998). Diese experimentellen Daten unterscheiden sich kaum von Simulationen mit 25 gekoppelten CAM-Oszillatoren (Beck *et al.*, 2001). Dies beruht auf dem Verlust der Phaseninformation jedes individuellen circadianen Oszillators, wenn die Temperatur hoch ist. Zusätzlich zeigen die Simulationen, dass Temperaturrauschen (*white noise*) die circadianen Oszillationen erhält, wenn die durchschnittliche Temperatur eigentlich zum Aussterben des Rhythmus führen würde (Beck *et al.*, 2001). Das Rauschen spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Übertragung des Signals zwischen einzelnen Oszillatoren.

Die Entdeckung und Beobachtung von zeit-räumlichen Phänomenen der Effizienz des Photosystems II bei tages- und endogener Rhythmik in *K. daigremontiana* (Rascher *et al.*, 2001) wurde durch die

Entwicklung von Systemen für die Abbildung der Chlorophyll-Fluoreszenz (Genty *et al.* 1989; Siebke & Weiss, 1995; Meyer & Genty, 1998; Osmond *et al.* 1998, 1999; Rascher *et al.* 2001; Fryer *et al.*, 2002; Oxborough, 2004) begünstigt. Die Abbildungen zeigten auf den Blättern Wellenphänomene im Tagesgang und oszillatorische Änderungen der Heterogenität der Lichtreaktionen im Dauerlicht (d. h., eine Synchronisierung, Desynchronisierung und Wiedersynchronisierung von Blattteilen). Unterschiede der CO<sub>2</sub>-Konzentration in verschiedenen Teilen der Blattgewebe wurden als die mögliche Ursache betrachtet. Die Autoren weisen darauf hin, dass es bestimmte Phasen für die Kopplung bzw. Entkopplung zwischen multiplen Oszillatoren gibt. Duarte *et al.* (2005) bewiesen durch die Nutzung von Abbildungen der Chlorophyllfluoreszenz parallel mit Gaswechselfmessungen in Blättern von *K. daigremontiana*, die teilweise mit Silikonfett bedeckt waren, dass eine laterale Diffusion von CO<sub>2</sub> im arrhythmischen und rhythmischen Zustand der endogenen Rhythmik (bzw. unter hohen und niedrigen Temperaturen) stattfinden kann. Im rhythmischen Zustand ermöglicht der CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus bei der Malat-Mobilisierung zusammen mit niedriger stomatärer Leitfähigkeit ein wesentlich stärkeres Potential für die laterale Diffusion. In diesem Zustand waren auch Wellen in der PSII-Aktivität zu beobachten. Das CO<sub>2</sub> kann deswegen der Kopplungsfaktor zwischen multiplen CAM-Oszillatoren sein.

## 1.6 Die C<sub>3</sub>-Photosynthese zeigt circadiane Oszillationen

Eine circadiane Steuerung wurde auch für unterschiedliche Aspekte der C<sub>3</sub>-Photosynthese beschrieben. Rhythmische Schwankungen der stomatären Leitfähigkeit können eine circadiane Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme in *Phaseolus vulgaris* beeinflussen (Hennessey and Field, 1991). Eine rhythmische Bewegung der stomatären Öffnungsweite wurde auch in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Somers *et al.* 1998). Auch die genetische Expression der kleinen Untereinheit der RUBISCO (RBCS) und der RUBISCO-Aktivase (RCA) hat circadiane Oscillationen im Dauerdunkel und Dauerlicht (Pilgrin & McClung, 1993). Die circadiane Expression der RBCS kann auch durch Lichtänderungen eingestellt werden (Giuliano *et al.* 1988). Die Verteilung der RUBISCO innerhalb der Chloroplasten von Dinoflagellaten ist ebenfalls, durch die circadiane Uhr gesteuert und beeinflusst die CO<sub>2</sub>-Fixierung (Nassoury *et al.* 2001). Die oben gegebenen Beispiele beschreiben eigentlich kein selbst erhaltendes circadianes Modell, wie der CAM, sondern biochemische Wege, die von einer anderen circadianen Uhr gesteuert sind. Das oszillatorische Verhalten der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme beim CAM unter konstanten Bedingungen ist auf diese Weise ein Zusammenspiel des CAM und der C<sub>3</sub>-Photosynthese. Wyka &

Lüttge (2003) zeigten, dass während der Gaswechseloszillationen bei *K. daigremontiana* im Dauerlicht eine progressive Steigung des C<sub>3</sub>-Beitrages der CO<sub>2</sub>-Aufnahme vorliegt, und dass ein Umschalten vom internen Malat-Rhythmus zu einem internen C<sub>3</sub>-Rhythmus erfolgen muss, ohne dass man das nach außen den Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme-Oszillationen ansieht. Es muss also übergeordnete Oszillatorelemente geben, die das organisieren. Boxall *et al.* (2005) haben gezeigt, dass in der C<sub>3</sub>/CAM-intermediären Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* die zentralen Oszillatorgene dieselben sind, wie bei der C<sub>3</sub>-Pflanze *Arabidopsis thaliana*, nämlich CCA1 (*Circadian Clock-Associated1*), LHY (*Late Elongated Hypocotyl*), TOC1 (*Timing of CAB Expression*), ELF4 (*Early Flowering4*), ZTL (*Zeitlupe*), FKF1 (*Flavin-Binding Kelch Repeat F-Box1*), ELF3 (*Early Flowering3*). Besonders interessant erscheint das TOC1-Protein, dessen Gen am späten Nachmittag und in der frühen Nacht besonders exprimiert ist, und dessen Abbau von CCA1 und LHY gesteuert wird, die mit gegenläufiger Phase schwingen. TOC1 könnte wesentlich am Umschalten zwischen subjektiven Tag- und Nachtreaktionen beteiligt sein. Es wird auch von rhythmisch schwankenden Expressionsfaktoren wie EE und ME (*evening element* bzw. *morning element*) gesteuert (Harmer & Kay, 2005). Bemerkenswert ist bei den Versuchen von Boxall *et al.* (2005), dass im Dauerlicht die Oszillationen des TOC1 Transkripts im C<sub>3</sub>-Zustand und im CAM-Zustand von *M. crystallinum* beide deutlich und die gegenläufigen Oszillationen von CCA1 und LHY etwas in ihrer Phase gegeneinander versetzt sind.

## 1.7 *Clusia minor* – ein Modell zur Untersuchung der Rhythmik im C<sub>3</sub>- und CAM-Zustand

Die vorliegende Arbeit bemüht sich, die circadianen Rhythmen der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme in einem System zu beobachten, wo eine Kontrolle über die Expression des CAM möglich ist. *Clusia minor* ermöglicht diese Art von Untersuchung, weil ihre Expression des CAM von Umgebungsbedingungen abhängig und reversibel ist. Die ersten Beweise für die intermediäre C<sub>3</sub>-CAM Photosynthese in *C. minor* kamen aus der Analyse der Kohlenstoffisotopen-Diskriminierung ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (Ting *et al.*, 1987). Das Umschalten zwischen den Photosynthesemodi wurde in Feldmessungen (Franco *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1988) und auch im Phytotron (Herzog *et al.*, 1999; Haag-Kerwer *et al.*, 1992; Franco *et al.*, 1990; de Mattos *et al.*, 1999; de Mattos & Lüttge, 2001; Franco *et al.*, 1991; Borland *et al.*, 1992; Borland & Griffiths, 1997) unter dem Einfluss mehrerer Umweltfaktoren beschrieben. Grundsätzlich sind die täglichen Temperaturbedingungen (Nachttemperatur niedriger als

Tagtemperatur) (Borland *et al.*, 1993; Grams *et al.*, 1997; Haag-Kerwer *et al.*, 1992; Herzog *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1998), hohe Lichtintensität (Grams *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 1991) und Trockenstress (Franco *et al.*, 1991, 1992; Borland *et al.*, 1996, 1998; Grams *et al.*, 1997, 1998) die wichtigsten Faktoren für die CAM-Induktion in *C. minor*. Außerdem speichern *C. minor* und andere *Clusia*-Arten während der Dunkelphase Zitrat in der Vakuole (Borland *et al.*, 1992; Franco *et al.*, 1990, 1991, 1996; Haag-Kerwer *et al.*, 1992; Lüttge, 1988; Popp *et al.*, 1987; Ting *et al.*, 1985). Die nächtliche Akkumulation von organischer Säure in *C. minor* ist auch vom Nitratgehalt im Boden abhängig (Franco *et al.* 1991). Zusätzlich wird die CAM-Induktion durch hohe Lichtintensität in *C. minor* durch UV-A/blaulicht Rezeptoren vermittelt (Grams *et al.*, 2002). Auch in *Mesembryanthemum crystallinum* beschleunigen abiotische Faktoren, wie Lichtintensität, Trockenstress oder Salzstress (McElwain *et al.*, 1992; Cockburn *et al.*, 1996; Miszalski *et al.*, 2001) die natürliche Umschaltung von der  $C_3$ -Photosynthese zum CAM. Diese Umschaltung ist im Gegensatz zu *C. minor* jedoch nicht reversibel (Cushman, 2001). Wegen der großen Zahl an Arbeiten zur photosynthetischen Plastizität der Art *C. minor* ist diese offensichtlich als alternatives Modell für die Untersuchung des endogenen Rhythmus geeignet, wo eine Kontrolle über die CAM Expression in Frage steht.

Die photosynthetische CAM-Plastizität von *Clusia minor* ist kein isolierter Fall. Sie wird auch in anderen Gattungen gefunden. Das intermediäre  $C_3$ -CAM Verhalten zeigt vielleicht die große Plastizität der CAM-Expression (Kluge *et al.* 2001) und ist auch innerhalb der Familien Aizoaceae, Crassulaceae, Portulacaceae und Vitaceae zu finden (Smith and Winter, 1996). Die plastische Expression des CAM innerhalb der Crassulaceae wurde intensiv untersucht (Kluge *et al.* 1991, 2001). Insbesondere enthält aber die Gattung *Clusia*  $C_3$ -, intermediäre  $C_3$ -CAM, und obligate CAM-Arten (Popp *et al.* 1987; Ting *et al.* 1985).

Tinoco Ojanguren und Vaquez Yanes (1983) haben den CAM in *Clusia* Arten, den einzigen bis jetzt bekannten dikotylen Bäumen mit CAM, entdeckt. Die erfolgreiche Ausbreitung des Genus *Clusia* in verschiedenen Ökosystemen innerhalb der intertropischen Zone des amerikanischen Kontinents (Willis 1973) ist mit seiner photosynthetischen Plastizität korreliert (Lüttge, 2000, 2004). Ökophysiologische Untersuchungen an *Clusia* Arten wurden in unterschiedlichen Ökosystemen mehrerer Länder durchgeführt. In Brasilien: zentrale Savanne, die „cerrados“ und Galleriewälder (*C. criuva*,  $C_3$ -CAM, Herzog *et al.*, 1999); sandige Ebene an der mittleren Küste, die *Restingas* (*C. fluminensis*; *C. hilariana*, CAM; *C. parviflora*  $C_3$ -CAM; Berg *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 1996; Liebig *et al.*, 2001; de Mattos *et al.*, 1997; Scarano *et al.*, 2005); Inselberge (*C. minor*, *C. parviflora*; Franco *et al.*, 1999, de Mattos *et al.*,

1997, Scarano *et al.*, 2001, 2005). In Venezuela: sekundäre Savannen und tropische Wälder (*C. multiflora*, C<sub>3</sub>; *C. minor* C<sub>3</sub>-CAM; *C. rosea*, *C. alata* und *Clusia* sp., CAM; Grams *et al.* 1997, Haag-Kerwer *et al.*, 1996). In Trinidad: sandige Ebene an der Küste, heraus erodiertes Gestein und Gebirge (700-940m) (*C. aripoensis*; *C. intertexa*; *C. minor*, *C. tocuchensis*, C<sub>3</sub>-CAM; Borland *et al.* 1992, 1994, 1996, Roberts *et al.* 1997, 1998). US Jungferninseln, kleine Antillen (*C. rosea*, C<sub>3</sub>-CAM; Ball *et al.*, 1991; Popp *et al.*, 1987; Sternberg *et al.*, 1987; Ting *et al.* 1985, 1987). Die Gattung *Clusia* inspiriert noch weitere ökophysiologische Arbeiten, und die Arten *C. spiritu sanctensis*, *C. marizii*, *C. intermedia* und *C. aemgdioi* werden im atlantischen Regenwald im Südosten Brasiliens erforscht (aktuelle bestehende Zusammenarbeit zwischen der Technischen Universität Darmstadt und der Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasilien).

## 1.8 Praktische Ziele

Die Untersuchung des endogenen Rhythmus in *C. minor* ist ein ganz neuer Ansatz zur Erfassung der Bedeutung der photosynthetischen Plastizität des CAM für sein Verhalten als circadiane Uhr. Dazu konzentrierte sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich auf Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenz-Messungen an *C. minor* Pflanzen die vorher zur C<sub>3</sub>-Photosynthese oder zum CAM- adaptiert wurden.

In der ersten Versuchsreihe wurden Tagesgänge der Photosynthese von C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen bei drei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Der endogene Rhythmus wurde dann bei denselben Temperaturen und Photosynthesemodi im Dauerlicht untersucht. Dies bringt Information über die Nachhaltigkeit der Rhythmen in Zusammenhang mit Temperatur. In einer zweiten Reihe von Versuchen im Dauerlicht wurde die Aktivität des Photosystem II ( $\phi_{PSII}$ ) durch Chlorophyllfluoreszenz bei nur einer Temperatur gemessen, um Details der Energetik der Photosynthese in den C<sub>3</sub>- und CAM-Zuständen zu vergleichen.

Die Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenz-Bildern erlaubte eine räumliche Auflösung der relativen Aktivität des Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ ). Die regelmäßige Nutzung dieser Technik parallel zu Gaswechsellmessungen ermöglichte die Untersuchung der Entwicklung von zeitlich-räumlichen Phänomenen der Nutzung von Lichtenergie in Tagesgängen und im Dauerlicht in C<sub>3</sub>- und CAM-adaptierten Pflanzen.



Um die photorespiratorische Aktivität zu unterdrücken und die maximale Carboxylase- Aktivität der RUBISCO zu enthüllen, wurde ein regelmäßiger Einsatz eines Gasgemisches mit 1% O<sub>2</sub> während der Messungen von Gaswechselfparametern und Chlorophyllfluoreszenzbildern benutzt. Die K<sub>m</sub> von RUBISCO für CO<sub>2</sub> liegt bei 9 µMol. Im Gegensatz dazu ist die K<sub>m</sub> diese Enzyme für O<sub>2</sub> um 535µM (Heldt, 2003). Das bedeutet, dass unter 1% O<sub>2</sub> die Oxygenase- Aktivität der RUBISCO völlig gehemmt wird. Die Applikation von 1% O<sub>2</sub> wurde in Tagesgang- und in Dauerlichtversuchen für C<sub>3</sub>- und CAM-adaptierte Pflanze verwendet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Pflanzen: *Clusia minor* L.

Für die Experimente wurde die  $C_3$ -/CAM intermediäre Art *Clusia minor* L. (Mutterpflanze aus der Sierra de San Luís, Falcón, Venezuela) verwendet (Abb. 1). Die Versuchspflanzen wurden vegetativ vermehrt und in Einheitserde (LD-80 Fruhstorfer-Erde, Industrie Erdenwerk GmbH & Co KG, Lauterbach) in den Gewächshäusern des Botanischen Gartens der TU-Darmstadt herangezogen. Nach der vollständigen Entwicklung der Wurzeln wurden die Pflanzen in das ökophysiologische Versuchsgewächshaus („Otto-Stocker-Haus“ oder „Ökohaus“) der TU-Darmstadt gebracht. Dort wuchsen sie unter kontrollierten Bedingungen heran (28 °C tagsüber, 20 °C nachts, relative Luftfeuchte 65 bis 80%). Im Winterhalbjahr wurde die tägliche Lichtperiode mit Hilfe von 400 Watt Halogen-Metall dampflampen (Scatto-TS mit HQI-TS WLD, Fa. Osram, Frankfurt am Main) auf 12 Stunden verlängert. Die dargestellten Experimente wurden an Pflanzen mit mindestens 10 Blattpaaren durchgeführt.

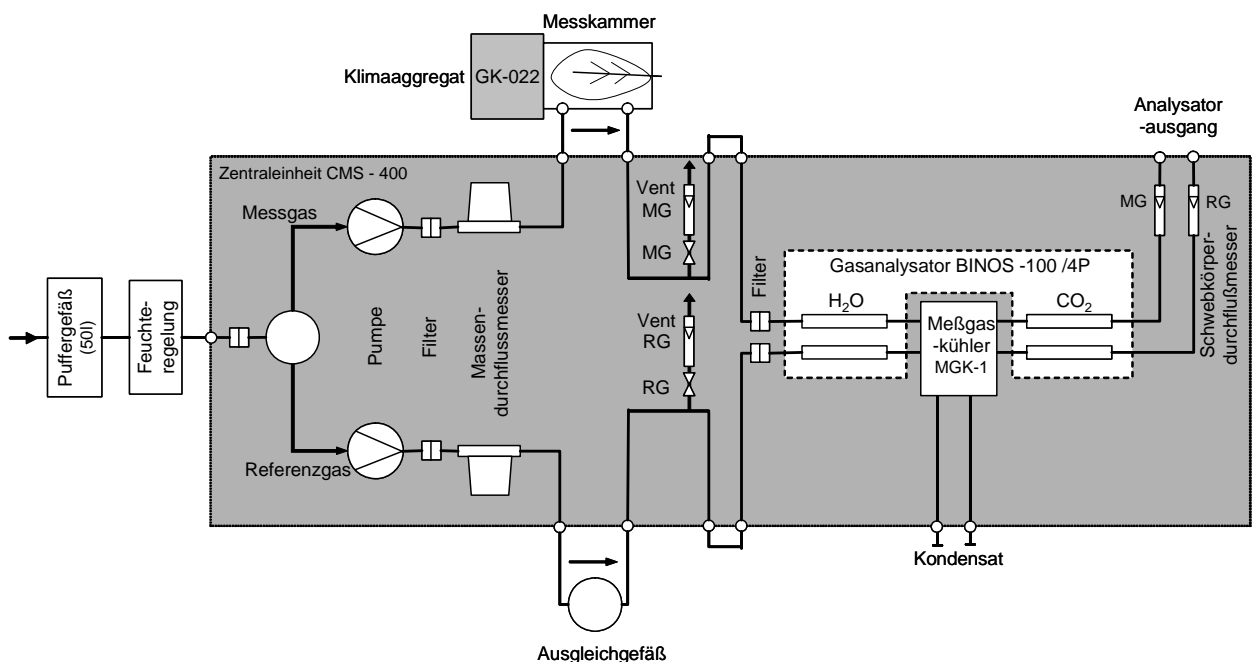


**Abb.: 2.1.** Versuchspflanze von *Clusia minor* L. im Otto-Stocker-Haus.

## 2.2 Messung des pflanzlichen Gaswechsels

### 2.2.1 Messsystem

Die Gaswechsellmessungen wurden mit einem Miniküvetten-System (Abb. 2.2) (Lange *et al.* 1984) der Firma Walz (Zentraleinheit: CMS400, Klimaaggregat: GK-020, Effeltrich) durchgeführt. Jeweils ein Blatt des zweiten oder dritten vollständig ausdifferenzierten Blattpaares von *C. minor* wurde in eine Plexigasküvette (1,1 Liter) eingesetzt und diese mit dauerelastischem Kitt (Terostat, Fa. Teroson, Heidelberg) luftdicht verschlossen. Dabei verblieb das Blatt unversehrt an der lebenden Pflanze. Durch die Küvette wurde Luft mit konstanter Flussrate (800 - 1200 ml pro Minute) geleitet. Die von der Versuchspflanze verursachten Änderungen in der  $\text{CO}_2$ -Konzentration zwischen Mess- und Vergleichs-gas, wurden mit einem Infrarot-Gasanalysator (BINOS 100 4P, Rosemount, Hanau) erfasst. Die Küvetten-temperatur wurde über einen Thermistor und durch das Klimaaggregat kontrolliert und mittels eines Thermistors erfasst. Ferner wurden die Blatttemperatur über ein Thermoelement



**Abb.: 2.2.** Schematische Darstellung des Gaswegs durch das verwendete Miniküvetten-System (verändert nach Produktinformationen der Fa. H. Walz, Effeltrich).

(Ni-NiCr), die Luftfeuchte in der Plexiglasküvette über eine Feuchtemesszelle und die Lichtintensität in und außerhalb der Plexiglasküvette über ein Silizium-Fotoelement bzw. über einen Quanten-Sensor (LI-COR LI 190 SZ, LI-COR Inc., Lincoln, USA) gemessen. Die relative Luftfeuchte wurde von einer Kältefalle am Eingang des Miniküvettenystems reguliert. Die Messwerte wurden in Zeitintervallen von 60 Sekunden mit Hilfe eines selbst erstellten Datalog-Programms (Programmiersprache Visual C++, V. 6.0, Microsoft Corporation) aufgezeichnet.

## 2.2.2 Berechnung der Gaswechseldaten

### 2.2.2.1 Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate

Die Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ) wird aus der Differenz der CO<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen Mess- und Vergleichsgas nach Gleichung (1) berechnet (Hall, 1982, Farquhar & Scarkey, 1982).

$$J_{CO_2} = \frac{\Delta_{CO_2} \cdot flow \cdot T_0 \cdot P_1}{f_{CO_2} \cdot A \cdot T_1 \cdot P_0} \quad [\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] \quad (1)$$

$\Delta_{CO_2}$	CO <sub>2</sub> -Konzentrationsdifferenz zwischen Mess- und Vergleichsgas	[ppm]
$flow$	Strömungsgeschwindigkeit des Mess- und Vergleichsgasstroms	[m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> ]
$A$	Blattfläche	[m <sup>2</sup> ]
$T_0$	Temperatur unter Standardbedingungen	[293,15K]
$T_1$	Temperatur unter Versuchsbedingungen	[K]
$P_0$	Luftdruck unter Standardbedingungen	[101,32Pa]
$P_1$	Luftdruck unter Versuchsbedingungen	[Pa]
$f_{CO_2}$	Empfindlichkeitsfaktor des BINOS bei einer CO <sub>2</sub> -Konzentration von 360 ppm	

Die Quotienten  $\frac{T_0}{T_1}$  und  $\frac{P_1}{P_0}$  stellen die Korrekturen für Temperatur und Luftdruck auf Standardbedingungen dar, die für die Umrechnung von ppm in  $\mu\text{mol m}^{-3}$  benötigt werden (1 ppm = 44,64  $\mu\text{mol m}^{-3}$ ).

### 2.2.2.2 Transpirationsrate

Analog zur Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate berechnet sich die Transpirationsrate ( $J_{H_2O}$ ) nach Gleichung (2).

$$J_{H_2O} = \frac{\Delta_{H_2O} \cdot flow \cdot T_0 \cdot P_1}{f_{H_2O} \cdot A \cdot T_1 \cdot P_0} \quad [\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}] \quad (2)$$

$\Delta_{H_2O}$  H<sub>2</sub>O-Konzentrationsdifferenz zwischen Mess- und Vergleichsgas [ppm]

$f_{H_2O}$  Empfindlichkeitsfaktor des BINOS für H<sub>2</sub>O

### 2.2.2.3 Wasserdampfdruck-Differenz

Bei der Berechnung der Wasserdampfdruckdifferenz ( $VPD$ ) zwischen dem Blattinneren und der Außenluft wurde vorausgesetzt, dass die relative Luftfeuchte im Blattinneren 100% beträgt. Dadurch wurde der Wasserdampfpartialdruck im Blattinneren ( $P_{wBl}$ ) über die Blattemperatur berechnet. Mit Hilfe des Wasserdampfpartialdrucks in der Küvette ( $P_{wK}$ ) und des Luftdrucks unter Standardbedingungen ( $P_0$ ) wird die VPD wie in Gleichung (3) dargestellt berechnet:

$$VPD = \frac{P_{wBl} - P_{wK}}{P_0} \quad [\text{mbar bar}^{-1}] \quad (3)$$

$P_{wBl}$  Wasserdampfpartialdruck im Blatt [mbar bar<sup>-1</sup>]

$P_{wK}$  Wasserdampfpartialdruck in der Küvette [mbar bar<sup>-1</sup>]

#### 2.2.2.4 Blattleitfähigkeit für Wasserdampf

Die Blattleitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ) ergibt sich nach Cowan (1977) aus:

$$g_{H_2O} = \frac{J_{H_2O}}{VPD} \quad [\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}] \quad (4)$$

#### 2.2.2.5 CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Blattgewebe

Die Diffusion von CO<sub>2</sub> in der Luft ist 1,6-mal langsamer als die von H<sub>2</sub>O. Wenn man dies berücksichtigt, kann die interne CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blattgewebe berechnet werden (Gleichung 5).

$$p_{CO_2}^i = p_{CO_2}^a - \frac{1,6 \cdot J_{CO_2}}{g_{H_2O}} \quad (5)$$

$$p_{CO_2}^i \quad \text{CO}_2\text{-Partialdruck im Blattgewebe} \quad [\text{Pa}]$$

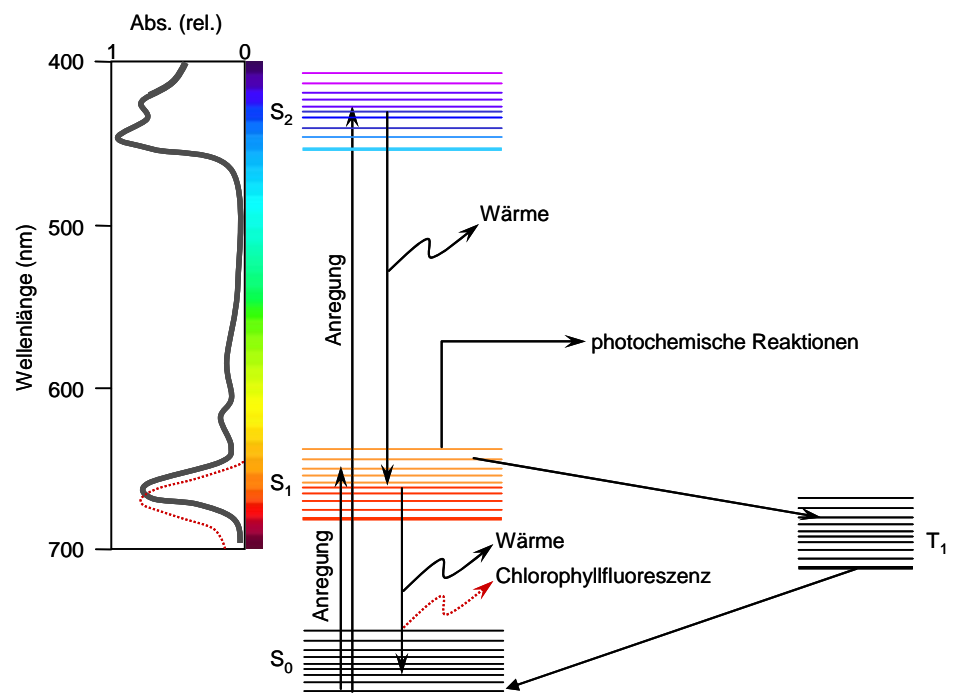
$$p_{CO_2}^a \quad \text{CO}_2\text{-Partialdruck in der Umgebung} \quad [\text{Pa}]$$

### 2.3 Chlorophyllfluoreszenz

#### 2.3.1 Theoretische Grundlagen der Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Chlorophyll *a* absorbiert besonders effektiv violett-blaues und rotes Licht (Abb. 2.3). Chlorophyll *b* absorbiert im blauen, zyanblauen und im orange-roten Bereich des Spektrums. Die Absorption von Lichtquanten erhebt eines der  $\pi$ -Elektronen aus dem System konjugierter Doppelbindungen der Porphyrinringe im Chlorophyll *a* vom Singulett Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_n$ . Langwelliges rotes Licht bewirkt den Übergang vom Grundzustand  $S_0$  zum Anregungszustand  $S_1$  und kurzwelliges blaues Licht zum Anregungszustand  $S_2$ . Der Anregungszustand  $S_2$  ist sehr energiereich und instabil, und das angeregte Elektron fällt rasch auf das  $S_1$ -Niveau zurück. Die Energiedifferenz zwischen Zustand  $S_1$  und  $S_2$  wird dabei in Form von Wärme freigesetzt (Abb. 2.3). Die Energie, welche

beim Rückfall eines Elektrons vom ersten Singulett-Zustand in den Grundzustand frei wird, kann prinzipiell auf unterschiedlichen Wegen genutzt werden, wird aber hauptsächlich für photochemische Reaktionen verwendet (Abb. 2.3). Besonders in den Photosystemen II und I treiben die durch Lichtenergie oxidierten Reaktionszentren die sofortige Reduktion der entsprechenden Akzeptoren (Chinon-A,  $Q_A$ , bzw. Ferredoxin, FD) an. Das ist der Hauptweg der Nutzung der Lichtenergie in photochemischen Reaktionen. Der Energiebetrag beim Übergang von  $S_1$  auf  $S_0$  kann auch in Form von Wärme oder als elektromagnetische Strahlung abgegeben werden. Der letztere Fall ist die Chlorophyllfluoreszenz, wobei das abgegebene Photon immer langwelliger ist als das absorbierte, da ein Teil der Energie als Wärme in die Vibrationskaskade freigegeben wurde. Vom  $S_1$ -Zustand aus kann das Elektron unter Umkehrung seines Spins auch auf den angeregten Triplett-Zustand ( $T_1$ ) fallen (Abb. 2.3). In intakten Thylakoidmembranen wurde  $T_1$ -Chlorophyll nur unter extremen Stressbedingungen nachgewiesen. Somit spielt dieser Zustand für die hier dargestellten Untersuchungen keine Rolle.



**Abb. 2.3.** Lichtabsorption Anregungszustände und Chlorophyllfluoreszenzstrahlung bei Chlorophyll-a.  $S_0$ : Singulett-Grundzustand;  $S_1$ : Singulett-Anregungszustand beim langwelligem Licht;  $S_2$ : Singulett-Anregungszustand beim kurzwelligem Licht;  $T_1$ : Triplett-Zustand.

Die photochemischen und nicht-photochemischen Dissipationsprozesse der Anregung nach Strahlungsabsorption konkurrieren miteinander und beeinflussen sich gegenseitig. Das bedeutet, dass der Fluoreszenzanteil nicht nur proportional zum absorbierten Quantenfluss (Strahlungsmenge pro Zeiteinheit) ist, sondern eine Funktion der Verhältnisse der Geschwindigkeiten der bei der Dissipation

konkurrierenden Reaktionen. Die Änderung der Umwandlung chemischer Energie (z.B. photosynthetische Aktivität) oder thermische Dissipation (Xanthophyllzyklus, Demmig-Adams & Adams, 1996) können beide die Fluoreszenzausbeute beeinflussen.

Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurden zwei Methoden verwendet, welche auf dem Sättigungspuls-Prinzip (Schreiber *et al.* 1986, 1995) basieren. In den folgenden Abschnitten werden die Systeme detailliert beschrieben.

### 2.3.2 Messsystem 1: PAM 101/102/103

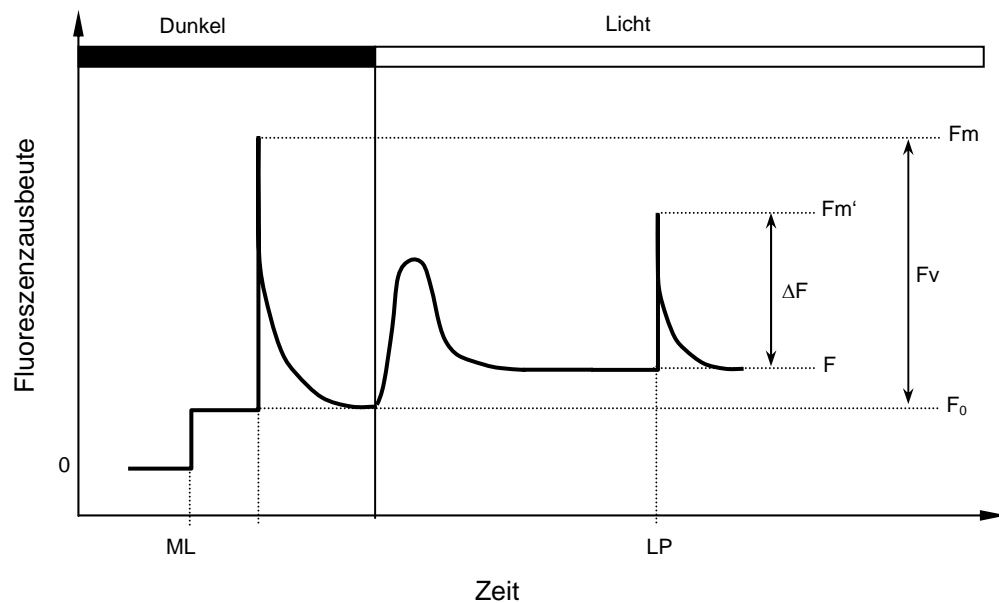
Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurde nach dem Puls-Amplituden-Modulations-Prinzip mit Hilfe einer Chlorophyllfluoreszenz-Meßanlage (PAM 101/102/103, Fa. Walz, Effeltrich, BRD) (Schreiber *et al.* 1986) durchgeführt. Hierbei wurde die Faseroptik der Chlorophyllfluoreszenz-Messanlage in einem Winkel von ca. 60° und einem Abstand von ca. 2 cm über dem Blatt der Versuchspflanze befestigt. Auf diese Weise wurde das Fluoreszenzsignal über einer Blattfläche von etwa 2 cm<sup>2</sup> integriert. Diese Messungen wurden an dem in die Gaswechselküvette eingesetzten Blatt durchgeführt. Durch das pulsierende Messlicht mit einer sehr geringen Lichtintensität (< 0,5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) wurden entweder die Grund- (F<sub>0</sub>) oder die „steady-state“-Fluoreszenz (F) kontinuierlich und ohne nennenswerte Beeinflussung der Photosynthese des Blattes erfasst. Im dunkeladaptierten Zustand erhält man nach dem Einschalten des Messlichtes die Grund-Fluoreszenz (F<sub>0</sub>). In diesem Zustand sind alle Reaktionszentren am Photosystem II offen, d.h. die primären Elektronenakzeptoren Q<sub>A</sub> sind oxidiert. Die maximale Fluoreszenz des dunkeladaptierten (F<sub>m</sub>) und des lichtadaptierten (F<sub>m</sub>') Blattes wurde durch kurze sättigende Lichtblitze (800 ms, PAR > 2500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) bestimmt (Abb. 2.4).

### 2.3.3 Berechnung der Chlorophyllfluoreszenz-Parameter

Die effektive Quantenausbeute des nichtzyklischen Elektronentransports ( $\Delta F / F_{m'}$ ) wurde nach Genty *et al.* (1989) sowie Schreiber und Bilger (1993) wie folgt berechnet:

$$\Delta F / F_{m'} = \frac{F_{m'} - F}{F_{m'}} \quad (6)$$





**Abb. 2.4.** Schematischer Verlauf einer Chlorophyllfluoreszenzmessung.  $F_0$ , Grundfluoreszenz;  $F_m$ , maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand;  $F_m'$ , maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand;  $F$ , „steady state“ Fluoreszenz;  $F_v$ , variable Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand;  $\Delta F$ , variable Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand; ML, Messlicht; LP, sättigender Lichtblitz.

Die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (*NPQ*, *non photochemical quenching*), wurde nach Bilger und Björkman (1990) berechnet:

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'} \quad (7)$$

### 2.3.4 Messsystem 2: Die Chlorophyllfluoreszenz-Kamera

Zur Aufzeichnung der Chlorophyllfluoreszenz eines an das Gaswechselanalysesystem angeschlossenen Blattes wurde eine von Rascher *et al* (2001) in Anlehnung an Siebke & Weis (1995) entwickelte Fluoreszenzkamera benutzt. Die Messanlage besteht aus einem beleuchtungs- und einem computergesteuerten Detektionssystem.

Das Beleuchtungssystem fungiert gleichzeitig als Lichtquelle für die Versuche und für die Sättigungslichtpulse. Es besitzt 8 Halogenlampen (ENH 120V 250W, Fa. Sylvania, Japan), die in einer

gekühlten Fassung (Dicrolight, Fa. JBSYSTEMS) auf einer Fläche von 20x30 cm angeordnet sind. Die Einstrahlungswinkel der 8 Lampen betrugen ca. 60°. Ein Infrarotsperfilter (KG-1, Dicke 5mm, Fa. Schott, Mainz) und ein Kurzpassfilter (No. 9782 4-96, blue-green, Dicke 5mm, Fa. Corning Inc., Jamaica, USA) vor jeder Lampe dienten dazu, den einstrahlenden Wellenlängenbereich auf  $\lambda < 650$  nm zu beschränken. Durch einen Dimmer wurde die Lichtintensität gesteuert. Für die Applikation der Sättigungslichtpulse wurde die Steuerung des Dimmers mittels eines computergesteuerten Relais überbrückt, wodurch Lichtpulse einer Lichtintensität von etwa  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ermöglicht wurden. Die Länge der Pulse war jeweils 800 ms. Zusätzlich war dem Beleuchtungssystem ein Spannungskonstanthalter nachgeschaltet, wodurch Netzschwankungen vermieden wurden und eine konstante Lichtintensität über die gesamte Versuchsdauer garantiert wurde.

Das Detektionssystem besteht aus einer computergesteuerten Digitalkamera (AP-1, Apogee Instruments Inc., Tucson, USA) mit einem gekühlten CCD-Chip (*Charge Coupled Device*) KAF-0401M (Eastman Kodak Company – Image Sensor Solutions – Rochester, NY, USA). Der Chip hat ein Aufnahmefeld von 768x512 Bildpunkten und kann bis 14bits Intensitätsstufen (16384 „grau“ Stufen) auflösen. Durch die lineare Lichtantwort des Sensors ist seine Nutzung für die Chlorophyllfluoreszenzmessung möglich. An die Kamera war ein 50 mm Makro Objektiv (Nikkor, Nikon Corporation Int.) mit einem Langpassfilter  $\lambda > 655$  (RG655, Dicke 5m, Fa. Schott, Mainz) angeschlossen. Das vom Blatt reflektierte Licht wird von diesem Filter abgefangen, der allerdings für die Chlorophyllfluoreszenz  $\lambda > 655$  durchlässig ist. Die Steuerung der Kamera und der Lichtpulse, und auch des „Oxomat“ (siehe Kap. 2.4.1: Bestimmung der photorespiratorischen Aktivität) erfolgte mit der Computer-Software PMIS Image (v. 1.1, GKR Computer Consultin, USA).

## 2.3.5 Berechnung der Chlorophyllfluoreszenz Parameter

### 2.3.5.1 Relative Quanteneffizienz des Elektrontransportes (rel. $\phi_{\text{PSII}}$ )

Korrespondierende Einzelbilder der entsprechenden „steady-state“-Fluoreszenz (F) bzw. der den maximalen Fluoreszenz des lichtadaptierten Blattes ( $F_m'$ ) werden im Folgenden als *LOW* bzw. *HIGH* bezeichnet. Digitale Abbildungen der relativen Quanteneffizienz des photosynthetischen Elektrontransportes (rel.  $\phi_{\text{PSII}}$ ) wurden wie folgt berechnet:

$$rel. \phi_{PSII} = \frac{HIGH - LOW}{HIGH} \quad (8)$$

Zur Berechnung dieser Parameter wurde ein neues Computer-Programm (Makro Sprache) in der Software PMIS (v1.1) in Eigenregie geschrieben (siehe Anhang). Zeitserien von Abbildungen der  $rel. \phi_{PSII}$  wurden in 16 Bits TIFF-Format (*Tagged Image File Format*) digital gespeichert.

### 2.3.5.2 Mathematische Quantifizierung der räumlichen Struktur der Chlorophyllfluoreszenz Bilder – das Heterogenitätsmaß

Die Heterogenitätsmaß wurde für die Bilder der relativen Quanteneffizienz des Elektrontransportes ( $rel. \phi_{PSII}$ ) in Anlehnung an Hütt & Neff (2001) bestimmt. Das Heterogenitätsmaß gibt hierbei den mittleren Abstand nächster Nachbarn einer Matrix  $B(t)$  zum Zeitpunkt  $t$  an.

$$I[B] = \frac{1}{A_B} \frac{1}{|V|} \sum_{(i,j) \in A_B} \frac{1}{|N_{ij}|} \sum_{b \in N_{ij}} |a_{ij} - b| \quad (9)$$

$|V|$  Anzahl der Elemente im Zustandsraum  $V$ , entspricht der maximalen Werte-Differenz zweier Zustände

$a, b$  Einträge in der Bild-Matrix

$i, j$  Matrixindizes

$N_{ij}$  Nachbarschaft um die Matrixposition  $(i, j)$

$|N_{ij}|$  Anzahl der Nachbarn

$A_B$  berücksichtigte Blattfläche

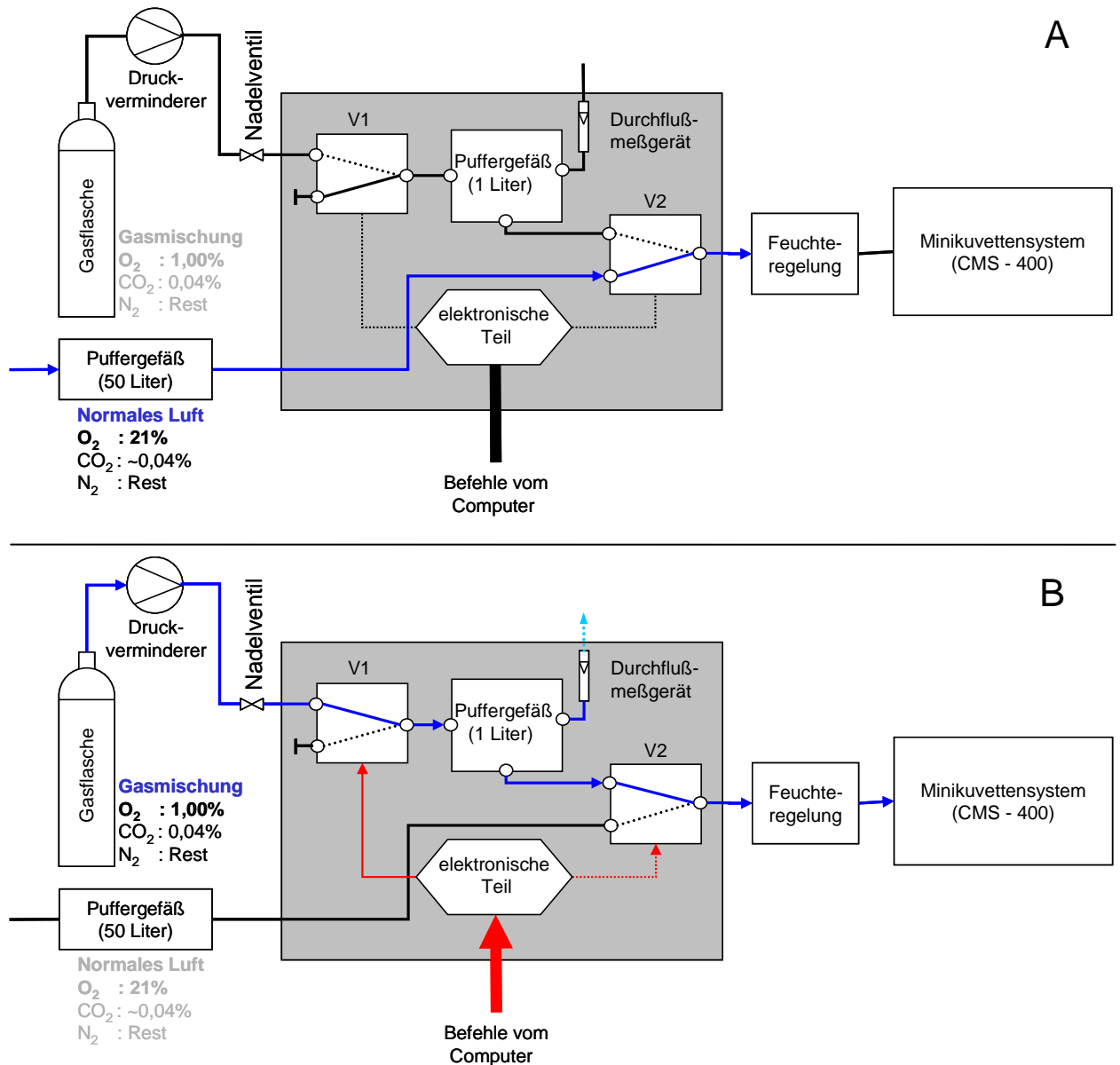
## 2.4 Bestimmung der photorespiratorischen Aktivität

### 2.4.1 Messsystem

Um photorespiratorische Bedingungen in der Küvette auszuschließen, wurde der so genannte „Oxymat“ konstruiert. Der Oxymat dient zur computergesteuerten Umschaltung zwischen normaler atmosphärischer Luft und einer künstlichen Gasmischung bestehend aus 1% O<sub>2</sub>, 0,04 % CO<sub>2</sub> und 98,96% N<sub>2</sub> (Messer, Griesheim) zur Versorgung des Miniküvetten-Systems. Der Oxymat wurde über dieselbe Software gesteuert, wie die Fluoreszenzkamera und konnte auf diese Weise mit ihr synchronisiert werden. Die Abbildung 2.5 zeigt die Schemata der Gaswege durch den Oxymat. Durch einen Druckminderer (Messer, Griesheim) wurde der Gasdruck der Gasflasche auf etwa 1,5 bar reduziert. Die Flussrate wurde mit einem Nadelventil kontrolliert. Wenn das elektrische Ventil 1 (V1) geöffnet wird, fließt die Gasmischung direkt in das Puffergefäß. Die Betätigung des Ventils 2 schließt den Gasweg von normaler Luft und ermöglicht die Versorgung des Miniküvettensystems direkt aus dem Puffergefäß (Abb. 2.5). Die restliche ungenutzte Gasmischung strömt aus dem Puffergefäß über einen Gasausgang und kann mit einem Nadelventil und einem Durchflussmesser auf einen minimalen Gasverlust kontrolliert werden. Dieser Gasausgang vermeidet die Erhöhung des Luftdrucks im Miniküvetten-System, der die Physiologie des Versuchsblattes beeinflussen, sowie Störungen im Meßsystem hervorrufen könnte.

### 2.4.2 Berechnung der photorespiratorischen Aktivität

Der „Oxymat“ ermöglicht es, das Miniküvetten-System periodisch mit einem künstlichen Gasgemisch (1% O<sub>2</sub>) zu versorgen. Die Abbildung 2.6 stellt eine typische Antwort der Netto CO<sub>2</sub>-Austauschrate eines C<sub>3</sub>-Photosynthese betreibenden Blattes von *Clusia minor* während zwanzigminütiger Verorgung mit künstlicher Luft (1% O<sub>2</sub>) dar. Kurz nach der Applikation der Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub>, stieg die Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate schnell an. Für die Messung der maximalen Carboxylierungsrate ( $J_{CO_2max}$ ) unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen sind mindestens fünf Minuten notwendig, bis das gesamte Volumen des Gaswegs des Miniküvetten-Systems vollständig gespült und durch die neue Gasmischung ersetzt ist. Deswegen wurden jeweils die ersten zehn Minuten der Messung von der Analyse ausgeschlossen, und die maximale Carboxylierungsrate unter Luft mit 1% O<sub>2</sub> wurde



**Abb. 2.5.** Schematisierte Gaswege im Oxymat. A) Normale Luft: Ventil 1 geschlossen Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub> fließt nicht; normale Luft mit 21% O<sub>2</sub> fließt durch das Ventil 2 in das Miniküvetten-system. B) Ventil 1 geöffnet, und Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub> fließt in das Puffergefäß; Ventil 2 schließt den Gasweg für normale Luft mit 21% O<sub>2</sub> und öffnet den Gasweg für die Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub>; das Miniküvetten-system pumpt die Gasmischung direkt aus dem Puffergefäß.

frühestens 10 Minuten nach Beginn der Applikation bestimmt. Aus der Differenz zwischen der maximalen ( $J_{\text{CO}_2\text{max}}$ ) und der normalen Carboxylierungsrate ( $J_{\text{CO}_2}$ ) wird die Photorespirationsrate ( $J_{\text{O}_2}$ ) ermittelt.  $J_{\text{O}_2}$  wird später in dieser Arbeit als Prozentsatz der maximalen Carboxylierungsrate dargestellt (prozentuale photorespiratorische Aktivität, %  $J_{\text{O}_2}$ ). Die photorespiratorische Rate ist ein Parameter, der, wie die Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme, von der momentanen Leitfähigkeit des Blattes für CO<sub>2</sub> abhängig ist. Deswegen ermöglicht die prozentuale Darstellung dieses Parameters die Analyse der relativen Oxygenaseaktivität der RUBISCO.

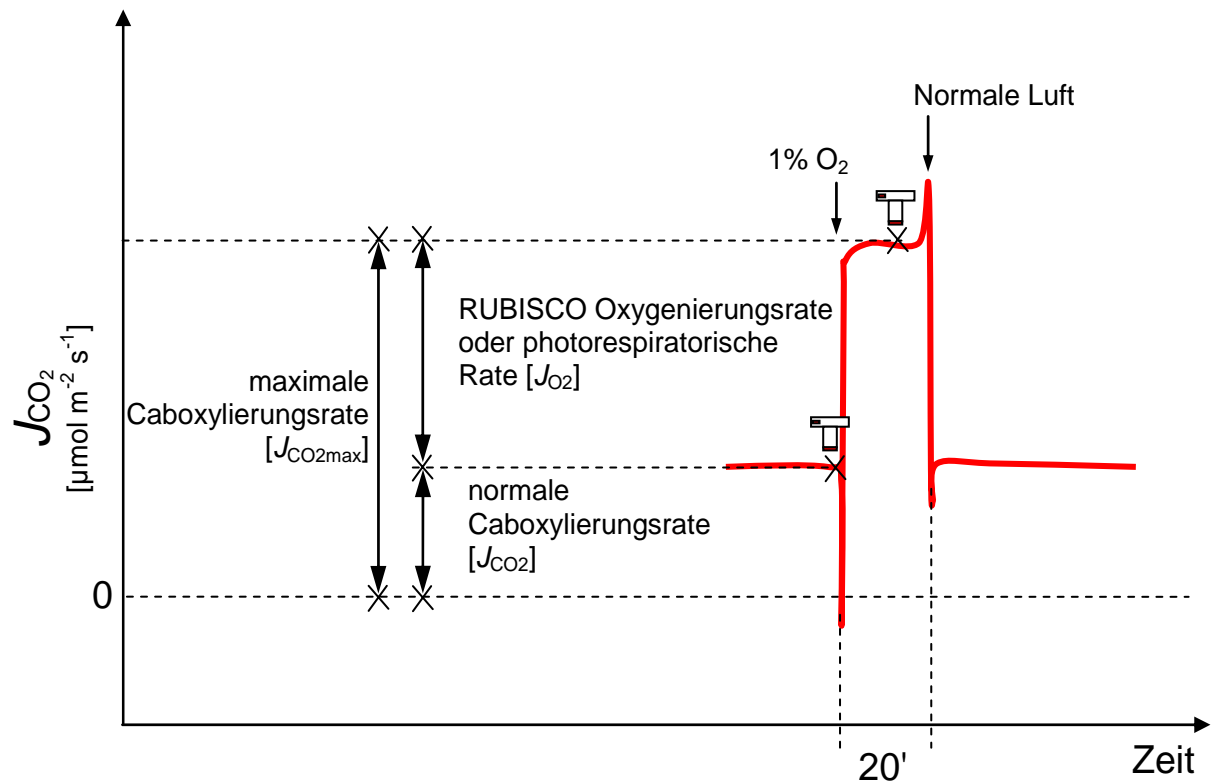



Abb. 2.6. Typischer Verlauf der Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate in einer C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanze während zwanzigminütiger Applikation einer künstlichen Gasmischung (1% O<sub>2</sub>).  Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenz-Bildern.

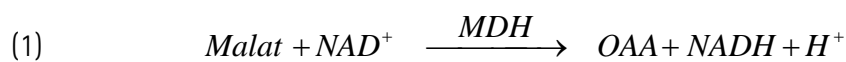
## 2.5 Analyse der organischen Säuren

### 2.5.1 Probenahme und Aufbereitung der Proben

Die Probenahme erfolgte durch Ausstanzen von jeweils 5 Blattscheiben aus 10 unterschiedlichen Pflanzen, die in dem Phytotron unter Bedingungen wie in dem Miniküvetten-System gehalten wurden. Während des Versuchs wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen, und zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Scheiben pro Blatt ausgestanzt. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur späteren Analyse bei -70°C aufbewahrt. Die Blattscheiben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit einem Pistill homogenisiert. Die Proben wurden nach der Zugabe von 1,0 ml bidestilliertem Wasser 10 min in einem Heizblock schnell auf 95°C erhitzt und anschließend für weitere 10 min mittels Ultraschall erneut homogenisiert. Der Überstand wurde nach 20 min Zentrifugation bei 9000 U min<sup>-1</sup> in einer Minifuge zur Analyse verwendet.

## 2.5.2 Bestimmung des Malatgehaltes

Der Malatgehalt wurde enzymatisch mittels einer für ELISA-Reader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) adaptierten Methode in Anlehnung an Möllering (1974) bestimmt. Grundlage dieser Methode ist die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat (OAA) durch das Enzym Malatdehydrogenase (MDH). Dabei wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  umgesetzt (1). Die dem Malatgehalt äquivalente Menge an NADH, wird photometrisch bei 340 nm bestimmt.



Da das Gleichgewicht dieser Reaktion weit auf der Seite des Malats liegt, muß für eine vollständige Umsetzung des Malats das entstehende OAA aus der Lösung entfernt werden. Dies wurde mit Hilfe von Glutamat und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) erreicht.

Pipettierschema:

100µl	Puffer (0,6 M Glycylglycin, 0,1 M Glutamat, pH 10)
20µl	NAD (ca. 43 mM)
132µl	H <sub>2</sub> O bidest.
5µl	GOT
10µl	Probe oder Standard (verdünnter Blattpreßsaft bzw. 2mM Malat)

nach 3 Minuten wurde die Extinktion  $E_1$  bestimmt

5µl MDH (5 mg/ml)

nach 10 Minuten wurde die Extinktion  $E_2$  bestimmt

10µl Malat (2 mM)

nach 20 Minuten wurde die Extinktion  $E_3$  bestimmt

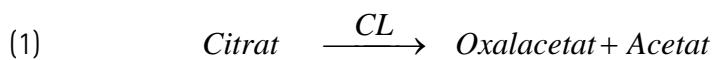
Berechnung des Malatgehalts:

$$\text{Malatgehalt} = \frac{E_{\text{Probe}} \cdot 40 \cdot \text{Probenverdünnung}}{E_{\text{Standard}} \cdot \text{Probenvolumen} \cdot 1000} \quad [\text{mM}]$$

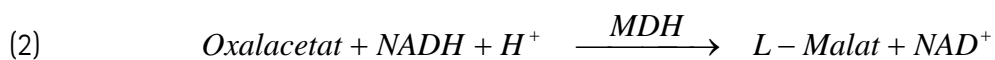
wobei  $E_{\text{Probe}}$  und  $E_{\text{Standard}}$  die Differenzen aus  $E_2$  und  $E_1$  der Probe bzw. des Standards (2 nmol Malat) sind. Durch die Messung von  $E_3$  nach Zugabe von Malat wurde kontrolliert, ob die Enzymaktivitäten für eine vollständige Umsetzung des Malats ausreichend waren.

### 2.5.3 Bestimmung des Citratgehaltes

Der Citrattgehalt wurde enzymatisch mittels einer für ELISA-Reader (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) adaptierten Methode in Anlehnung an Möllering (1985) bestimmt. Citrat wird in der durch das Enzym Citrat-Lyase (CL) katalysierte Reaktion in Oxalacetat und Acetat überführt (1).



In Gegenwart der Enzyme Malat-Dehydrogenase (MDH) und L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) werden Oxalacetat und dessen Decarboxilierungs-Produkt Pyruvat durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Malat bzw. L-Lactat reduziert.



Die Summe der während der Reaktionen (2) und (3) verbrauchten NADH-Mengen ist der Citrat-Menge äquivalent. NADH ist Meßgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365nm.



Pipettierschema:

500µl	Puffer (0,6 M Glycylglycin/0,1 M L-Glutamat, pH 10,0)
100µl	NAD <sup>+</sup> (47 mM)
5µl	GOT (1 mg GOT/ml)
700 µl	Aqua bidest.
50µl	Probe

nach 3 Minuten wurde die Extinktion  $E_1$  bestimmt

5 µl	L-MDH (5 mg /ml)
------	------------------

nach 20 Minuten wurde die Extinktion  $E_2$  bestimmt

Berechnung des Citratgehaltes:

$$\text{Citrat [mM]} = \frac{V \times M_r}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times (E_2 - E_1),$$

wobei

$V$  = Testvolumen [ml]

$v$  = Probevolumen [ml]

$M_r$  = Molmasse der zu bestimmenden Substanz [für Malat 134,09 g/mol]

$d$  = Lichtweg [cm]

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADH+H<sup>+</sup> bei 340 nm [6,22 cm<sup>2</sup>/µmol]

## 2.6 Anatomische Untersuchungen: Einbettung und Mikroskopie des Blattmaterials

Blattstücke von *C. minor* von etwa 5x3 mm Größe wurden aus den Interkostalfeldern und aus dem zentralen Bereich der Hauptleitbündel herausgeschnitten, in einer Mischung aus Glutaraldehyd (0,5%) und Paraformaldehyd (2%) in Phosphatpuffer (0,1%, pH 6,8) dreimal für 1 Minute vakuuminfiltriert und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Infiltration wurden die Blattstücke in Phosphatpuffer (0,1%, pH 6,8) gewaschen und in Lösungen mit steigenden Ethanolkonzentrationen (bis 95% EtOH in H<sub>2</sub>O) entwässert. Das Material wurde dann in 2-Hydroxyethyl Methacrylat (HEMA, Technovit 7100, Heraeus Kulzer) eingebettet. Nach der Aushärtung wurden Schnitte von 5 µm Dicke (Rotationsmikrotom 3455 Leitz; Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Toluidinblau (0,1%) (Fa. Merk, Darmstadt) angefärbt und unter dem Lichtmikroskop (Aristoplan Mikroskop, Fa. Leica, Wetzlar) analysiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Die Adaptation der Pflanzen zum C<sub>3</sub>- oder CAM-Zustand.

*C. minor* ist eine C<sub>3</sub>/CAM- intermediäre Pflanze, deren photosynthetischer Zustand von äußeren Bedingungen, wie Lichtintensität, Tag-/Nacht-Temperatur und Wasserversorgung abhängt (Franco *et al.*, 1991, 1992; Haag-Kerwer *et al.*, 1992; Borland *et al.*, 1993, 1996, 1998; Grams *et al.*, 1997, 1998, 2001; Roberts *et al.*, 1998; Herzog *et al.*, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der endogene Rhythmus der Photosynthese, d.h. der Gaswechselfparameter und der relativen Aktivität des Photosystem II, von Pflanzen im C<sub>3</sub>- und im CAM-Zustand untersucht werden. Dazu mussten die Pflanzen durch die Wahl der geeigneten Außenbedingungen zum C<sub>3</sub>- bzw. CAM-Zustand adaptiert werden.

Hier werden erst die Bedingungen, die zur C<sub>3</sub>-Photosynthese führen, genannt:

- niedrige Lichtintensität;
- gleiche Tag/Nacht-Temperatur;
- gute Wasserversorgung;

dann die Bedingungen, die zum CAM führen:

- hohe Lichtintensität;
- Tag-/Nacht-Temperaturwechsel (heißer am Tag und kühler am Abend);
- Trockenstress.

Bei Beleuchtung mit höheren Lichtintensitäten als  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  starben die in das Miniküvetten-system eingebrachten Blätter ab. Aus diesem Grund wurde zur Induktion der CAM-Photosynthese keine Beleuchtung mit erhöhter Lichtintensität, sondern lediglich ein kurzer Trockenstress (3 bis 4 Tage vor Applikation von Dauerlicht) benutzt.

Tabelle 1 zeigt die Malat- und Citratgehalte in Blättern von *C. minor*-Pflanzen, die zum C<sub>3</sub>- und CAM-Zustand adaptiert waren, im täglichen Licht-/Dunkel-Rhythmus bei 25°C kurz vor Beginn und gegen Ende der Lichtphase. Die CAM-adaptierten Pflanzen hatten kurz vor Anfang der Lichtphase fast fünfmal mehr Malat und fast zehnmal mehr Citrat akkumuliert als die C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen. In der

Lichtphase verbrauchten die CAM-adaptierten Pflanzen sowohl Malat als auch Citrat, während der Säuregehalt sich bei den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen nicht änderte.

**Tabelle 1.** Malat- und Citratgehalt von C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen am Anfang und am Ende der Lichtphase (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und Probenanzahl). Die Pflanzen wurden unter konstanter Temperatur von 25°C und Lichtintensität von ca. 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  voradaptiert. Verschiedene hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; Student's *t*-Test) zwischen C<sub>3</sub>- und CAM-adaptierten Pflanzen und kleine Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Zeiten der Probenahme an.

Organische Säure	Photosynthese modus	
	C <sub>3</sub>	CAM
<b>Malat</b>	mmol m <sup>-2</sup>	mmol m <sup>-2</sup>
Eine Stunde vor Beginn der Lichtphase	25 $\pm$ 10 (5) <sup>Aa</sup>	120 $\pm$ 26 (5) <sup>Ba</sup>
Eine Stunde vor Ende der Lichtphase	26 $\pm$ 6 (4) <sup>Aa</sup>	70 $\pm$ 1 (5) <sup>Bb</sup>
<b>Citrat</b>		
Eine Stunde vor Beginn der Lichtphase	14 $\pm$ 9 (4) <sup>Aa</sup>	133 $\pm$ 39 (5) <sup>Ba</sup>
Eine Stunde vor Ende der Lichtphase	20 $\pm$ 6 (4) <sup>Aa</sup>	37 $\pm$ 15 (3) <sup>Bb</sup>

### 3.2 Analyse von Tagesgängen in *C. minor* im normalen täglichen Licht-/Dunkel-Rhythmus

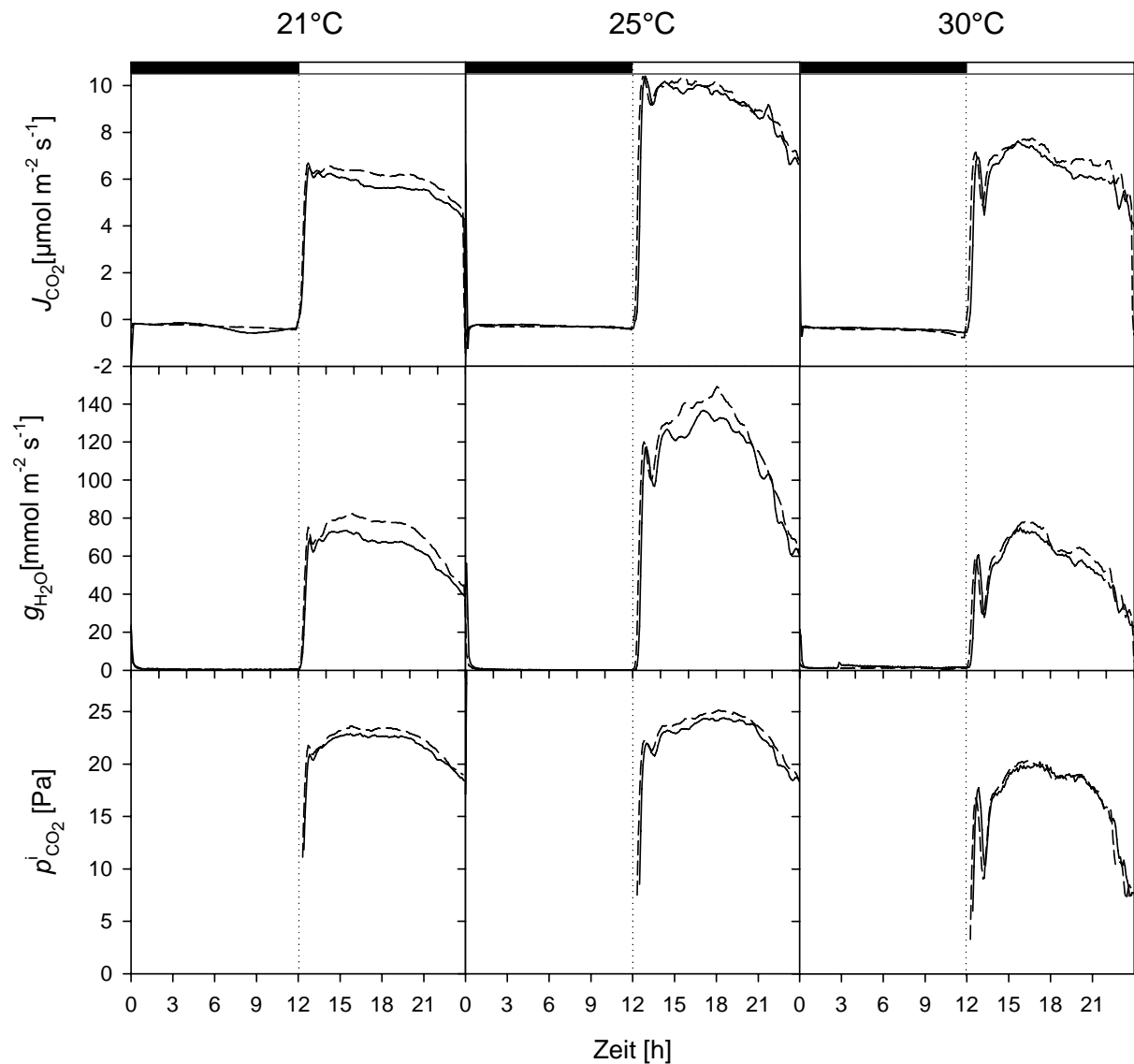
Ein stabiles Gaswechsellmuster war die Voraussetzung dafür, die Pflanze zum Studium der endogenen Photosyntheserhythmik unter Dauerlicht zu exponieren. Diese Voraussetzung war dann gegeben, wenn das untersuchte Blatt während mindestens zwei aufeinander folgenden Licht/Dunkel Perioden ein sehr ähnliches Gaswechsellmuster für entweder den CAM- oder den C<sub>3</sub>-Zustand aufwies. Unter Berücksichtigung, dass sich während der Dauerlichtphase Prozesse des Stoffwechsels in circadianen Perioden wiederholen, geben die Daten des Tagesganges im normalen Licht-/Dunkelrhythmus Informationen darüber, wann bestimmte Prozesse zu erwarten sind.

### 3.2.1 Tag/Nacht Rhythmus in $C_3$ - und CAM- adaptierten *C. minor*-Pflanzen bei unterschiedlichen Temperaturen

$C_3$ -adaptierte Pflanzen zeigten während der Dunkelphase keine detektierbare Carboxylaseaktivität. Die Netto- $CO_2$ -Austauschraten ( $J_{CO_2}$ ) waren aufgrund der dunkel-respiratorischen Aktivität immer geringfügig negativ, und die Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ) lag immer gegen Null (Abb. 3.1). Die interne  $CO_2$ -Konzentration im Blattgewebe war hier wegen der geringen Werte von  $g_{H_2O}$  nicht bestimmbar. Während der Lichtphase unterschieden sich die Carboxylaseaktivitäten der Pflanzen bei den drei Temperaturbehandlungen. Bei 25°C war die Assimilation von  $CO_2$  deutlich höher als bei 21°C bzw. 30°C und durch höhere stomatäre Öffnung erleichtert. Die Schwankungen der  $CO_2$ -Assimilation unter konstanten Bedingungen während der Lichtphase (Licht, Temperatur und VPD) (siehe unten Kapitel 3.3) weisen darauf hin, dass besonders bei 25°C eine endogene Kontrolle der Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf besteht.

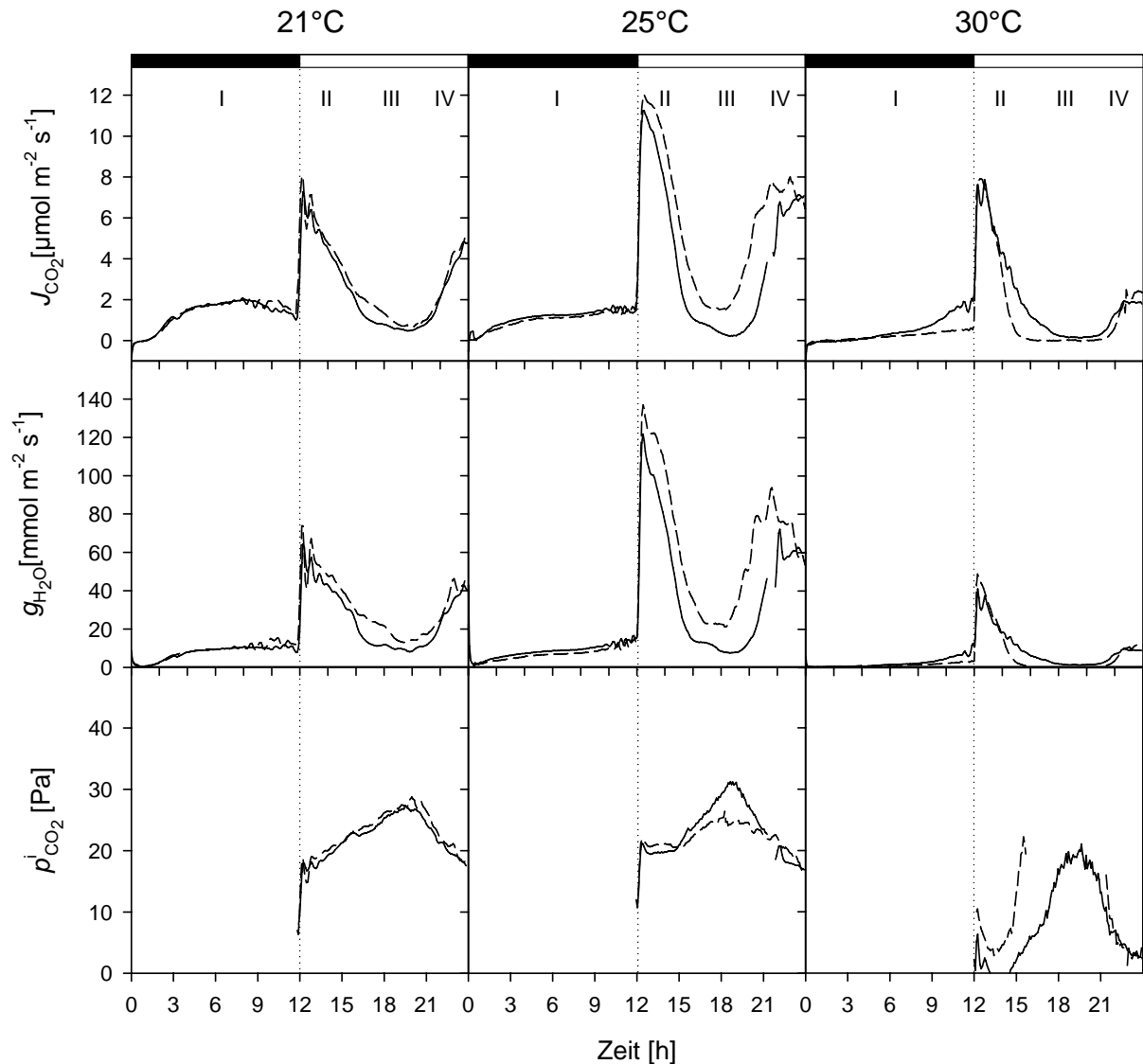
Der  $CO_2$ -Partialdruck ( $p_{CO_2}^i$ ) im Blatt war bei 30°C am niedrigsten, unterschied sich jedoch nicht wesentlich bei 21° und 25°C. Es zeigte sich, dass innerhalb jeder Temperaturbehandlung  $p_{CO_2}^i$  von  $g_{H_2O}$  abhängig ist (siehe auch Abb. 3.3). Zur Beobachtung von Auswirkungen endogener Prozesse auf photosynthetische Parameter war von den gewählten Versuchstemperaturen 25°C am besten geeignet.

Im Gegensatz zu  $C_3$ -adaptierten Pflanzen wurde bei CAM-adaptierten Pflanzen unter den drei dargestellten Bedingungen während der Dunkelphase Carboxylaseaktivität beobachtet. D. h., der Crassulaceen-Säure-Stoffwechsel (CAM) wurde bei allen Temperaturbehandlungen durch einen kurzen Wasserstress initiiert. Die entsprechenden vier Phasen des CAM (nach Osmond, 1978) sind in Abb (3.2) gut zu erkennen, die Phasen unterscheiden sich jedoch bei den verschiedenen Temperaturbehandlungen. Bei 21°C und 25°C war die  $CO_2$ -Aufnahme im Dunkeln (Phase I) deutlich höher als bei 30°C. Die Präsenz der intermediären Phasen II und IV war bei allen Temperaturbehandlungen deutlich zu erkennen, ihre Amplituden waren jedoch bei 25°C am höchsten. In der Phase III, wenn organische Säuren decarboxyliert werden, stieg der  $CO_2$ -Partialdruck ( $p_{CO_2}^i$ ) im Blatt und verursachte das Schließen der stomatären Öffnungen, was bei allen drei Temperaturen deutlich zu erkennen war. Hier erreichte  $p_{CO_2}^i$  die höchsten Werte, besonderes bei 25°C in der ersten Wiederholung.



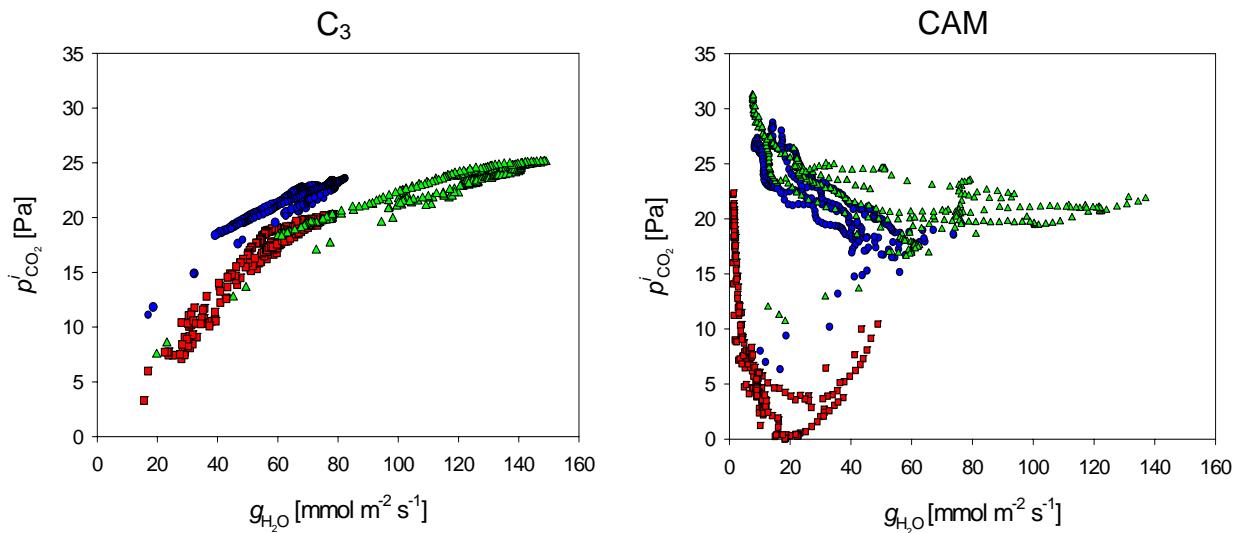
**Abb. 3.1.** Gaswechselanalyse von  $C_3$ -adaptierten Pflanzen bei drei unterschiedlichen Temperaturen (21°C, 25°C und 30°C): Netto  $CO_2$ -Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ), stomatare Wasserdampfleitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) und interzelluläre  $CO_2$ -Konzentration ( $p_{CO_2}^i$ ). Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Wiederholungen, die an zwei aufeinander folgenden Tagen nach der Adaptationsphase durchgeführt wurden. Die Lichtintensität war  $120 \pm 12 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ .

Die Abbildung (3.3) zeigt den Zusammenhang zwischen  $g_{H_2O}$  und  $p_{CO_2}^i$  während der Lichtphase in  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen. Die zugrunde liegenden Daten wurden den Experimenten der Abbildungen 3.1 und 3.2 entnommen. Es zeigte sich, dass die interne  $CO_2$ -Konzentration im Blattgewebe  $C_3$ -adaptierter Pflanzen unmittelbar durch die stomatare Öffnungsweite kontrolliert wird. Je höher die stomatare Leitfähigkeit, desto höher war der interne  $CO_2$ -Partialdruck, unabhängig von der Versuchstemperatur (Abb. 3.3).



**Abb. 3.2.** Gaswechselanalyse von CAM-adaptierten Pflanzen bei drei unterschiedlichen Temperaturen (21°C, 25°C und 30°C): Netto CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{\text{CO}_2}$ ), stomatäre Wasserdampfleitfähigkeit ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ) und interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration ( $p_{\text{CO}_2}^i$ ). Dargestellt sind jeweils zwei repräsentative Wiederholungen, die an zwei aufeinander folgenden Tagen nach der Adaptationsphase durchgeführt wurden. Die Lichtintensität war  $120 \pm 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Ein völlig anderes Bild zeigte sich im Falle der CAM-adaptierten Pflanzen. Zunächst stellte sich durch die Decarboxylierung des gespeicherten Malats bei geschlossenen Stomata (niedriges  $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ) eine hohe interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration ein. Beim Durchlaufen der Phase III wurde der interne Malatspeicher aufgebraucht, und entsprechend sank der interzelluläre CO<sub>2</sub>-Partialdruck. Im weiteren Verlauf (Phase IV) zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem interzellulären CO<sub>2</sub>-Partialdruck ( $p_{\text{CO}_2}^i$ ) und der stomatären Leitfähigkeit ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ), d.h. die CAM-adaptierten Pflanzen verhielten sich wie C<sub>3</sub>-Pflanzen und öffneten die Stomata, um CO<sub>2</sub> aufnehmen zu können. Diese Korrelationen wiesen jedoch bei den verschiedenen



**Abb. 3.3.** Interzellulärer CO<sub>2</sub>-Partialdruck ( $p'_{\text{CO}_2}$ ) in Abhängigkeit von der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ) bei C<sub>3</sub>- und CAM-adaptierten Pflanzen. Dargestellt sind jeweils Experimente bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (blaue Kreise, 21°C; grüne Dreiecke, 25°C; rote Vierecke: 30°C).

Temperaturbedingungen eine große Varianz auf. Bei 30°C waren Schwankungen von  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  und  $p'_{\text{CO}_2}$  auf den Bereich niedrigerer Werte beschränkt. Auch bei 21°C war  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  auf vergleichsweise niedrige Werte ca. 10-70 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> beschränkt,  $p'_{\text{CO}_2}$  erreichte dagegen aber durchschnittlich hohe Werte im Bereich von ca. 6 - 28 Pa. Bei 25°C wurden die höchsten Werte von  $p'_{\text{CO}_2}$  bei der gleichzeitig größten Varianz von  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  beobachtet. In CAM-adaptierten Pflanzen wird die interzelluläre CO<sub>2</sub>-Konzentration über den CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus des CAM und über die stomatäre Wasserleitfähigkeit reguliert. Im Gegensatz dazu wird bei C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen die Regulation ausschließlich nur über die stomatäre Öffnungsweite kontrolliert.

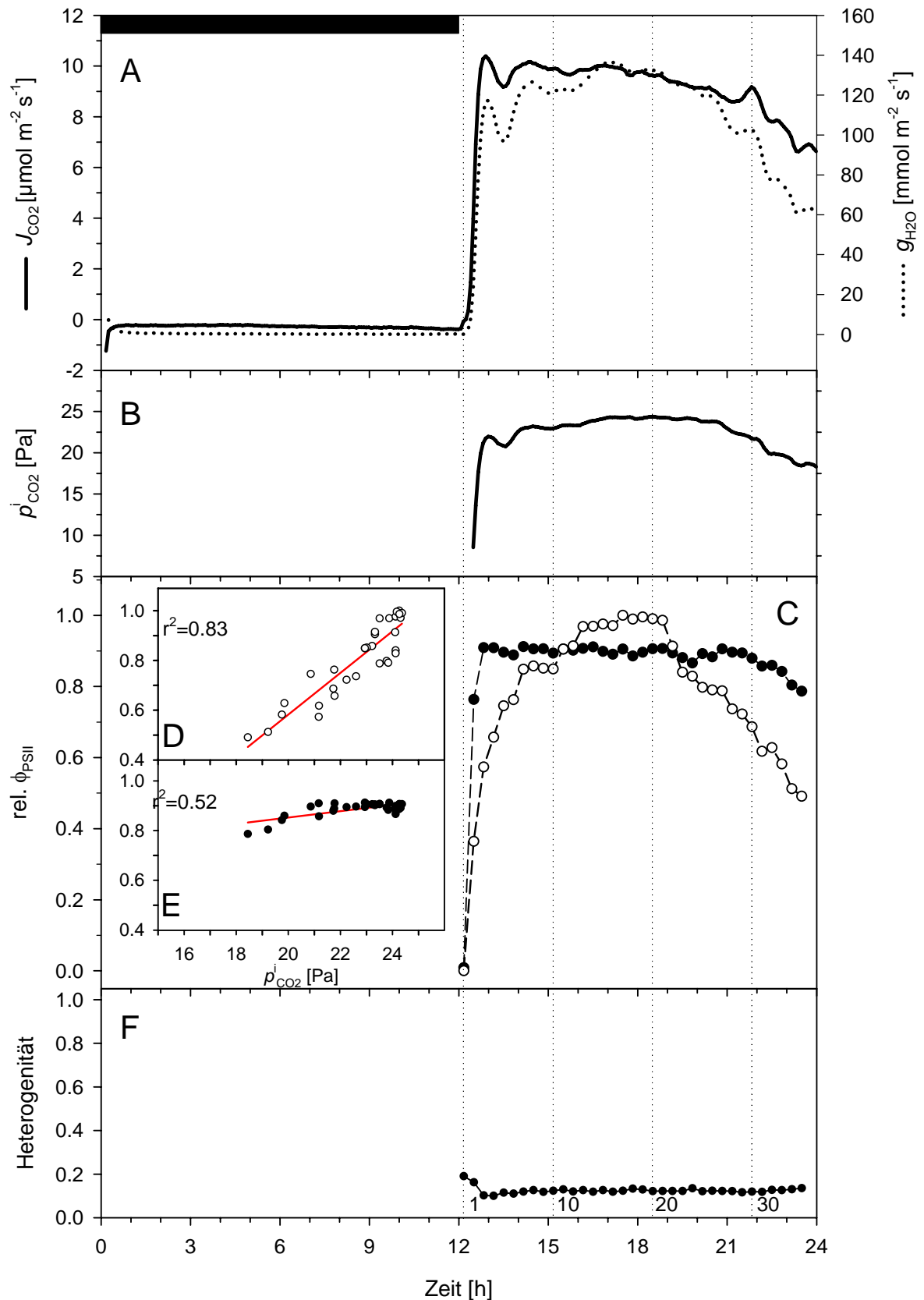


### 3.2.2 Zeit-räumliche Dynamik des Tagesverlaufes von $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor* bei 25°C

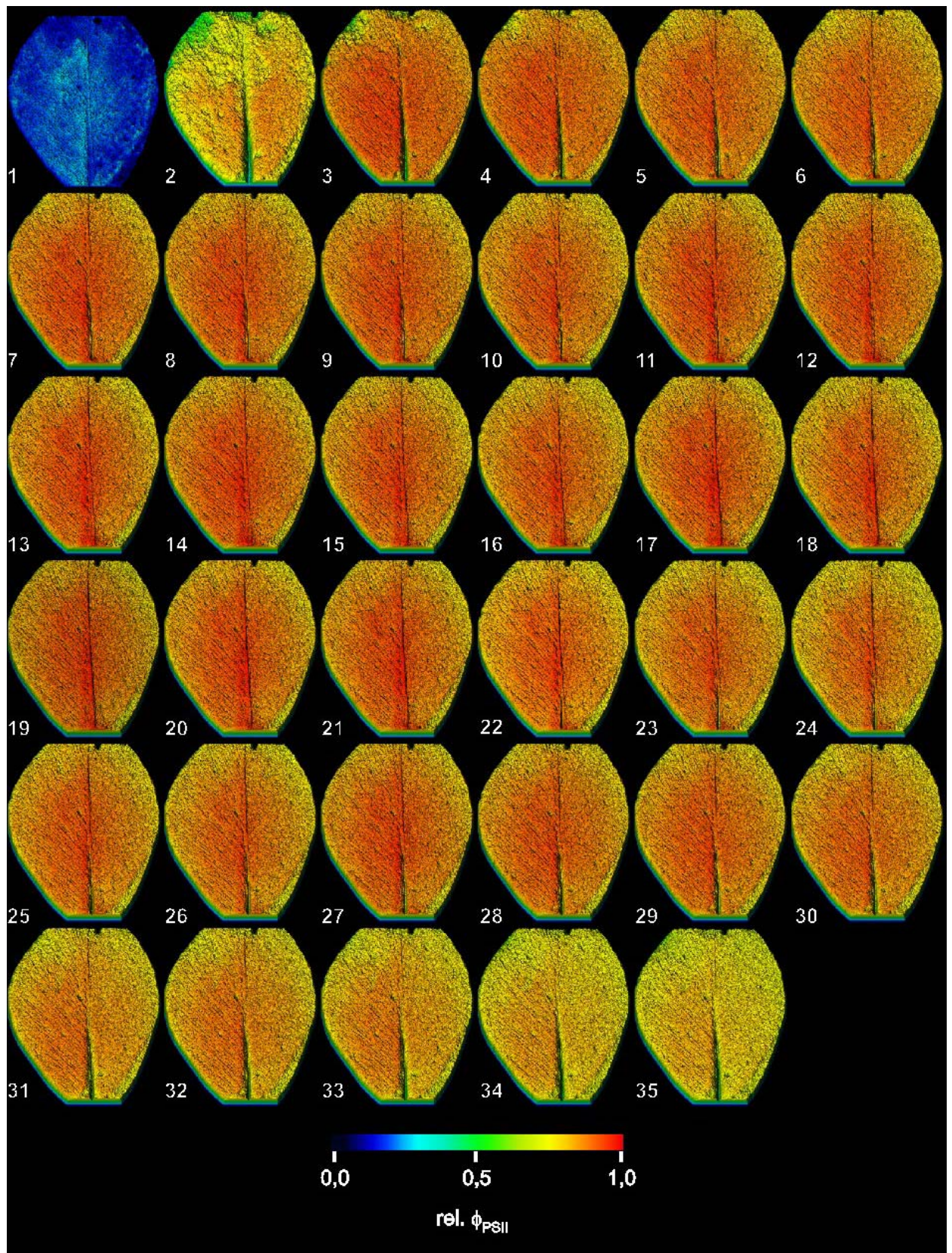
Die mit der Chlorophyllfluoreszenzkamera erhaltenen Abbildungen der relativen Aktivität von Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ ) ermöglichten es, parallel zu den Gaswechsellmessungen die zeitliche und räumliche Dynamik der Lichtreaktionen der Photosynthese zu verfolgen und die Unterschiede dieser Dynamik in  $C_3$ - und CAM- adaptierten Blättern zu betrachten. Die Abbildungen 3.4 bis 3.7 fassen die repräsentative Analyse von Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenzdaten für  $C_3$  und CAM adaptierte Pflanzen von drei Wiederholungen zusammen. Die Abbildungen 3.4 A, B und 3.6 A, B zeigen die typischen Gaswechselparameter, d. h. die Netto- $CO_2$ -Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ), die stomatäre Wasserdampfleitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) und den interzellulären  $CO_2$ -Partialdruck ( $p_{CO_2}^i$ ) einer  $C_3$ - und einer CAM- adaptierten Pflanze. Der Verlauf der relativen Quanteneffizienz von Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ ) (Abb. 3.4 C und 3.6 C) wurde für einen Ausschnitt auf den Interkostalfeldern und auf den Hauptleitbündeln berechnet (Abb. 3.5 und 3.7). Für denselben Ausschnitt der Interkostalfelder wurde zusätzlich, wie in den Abbildungen 3.4 F und 3.6 F dargestellt, das Heterogenitätsmaß der  $\phi_{PSII}$ -Verteilung bestimmt.

In der  $C_3$ -adaptierten Pflanze stiegen in den ersten fünfzig Minuten der Lichtphase  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  schnell an. Die relative Aktivität des Photosystems II (rel.  $\phi_{PSII}$ ) auf dem Interkostalfeld folgte dem gleichen Verlaufsmuster. Während dieser kurzen Periode wurde eine sehr geringe Änderung der  $\phi_{PSII}$ -Heterogenität beobachtet (Abb. 3.4 F und 3.5), die wahrscheinlich als Folge der schnellen Erhöhung der  $p_{CO_2}^i$ -Werte, von  $g_{H_2O}$  abhängig war. Innerhalb des Interkostalfeldes war  $\phi_{PSII}$  etwa 9 Stunden lang relativ konstant und fiel dann nur am Ende der Lichtphase geringfügig ab. Die  $\phi_{PSII}$ -Heterogenität war sehr gering und hat sich während der ganzen Lichtphase nicht geändert.

Ein anderer  $\phi_{PSII}$ -Kurvenverlauf wurde bei den Hauptleitbündeln beobachtet. Hier stieg  $\phi_{PSII}$  langsamer an als beim Interkostalfeld, erreichte aber höhere Werte in der Mitte der Lichtphase und fiel dann wieder zu niedrigeren Werten am Ende der Lichtphase ab. Die Abhängigkeit von  $\phi_{PSII}$  von  $p_{CO_2}^i$  wurde für die beiden Messbereiche beobachtet, war aber auf den Hauptleitbündeln deutlich höher als auf dem Interkostalfeld. Dies zeigte, dass im Bereich der Hauptleitbündel größere Schwankungen der  $CO_2$ -Konzentration vorlagen.



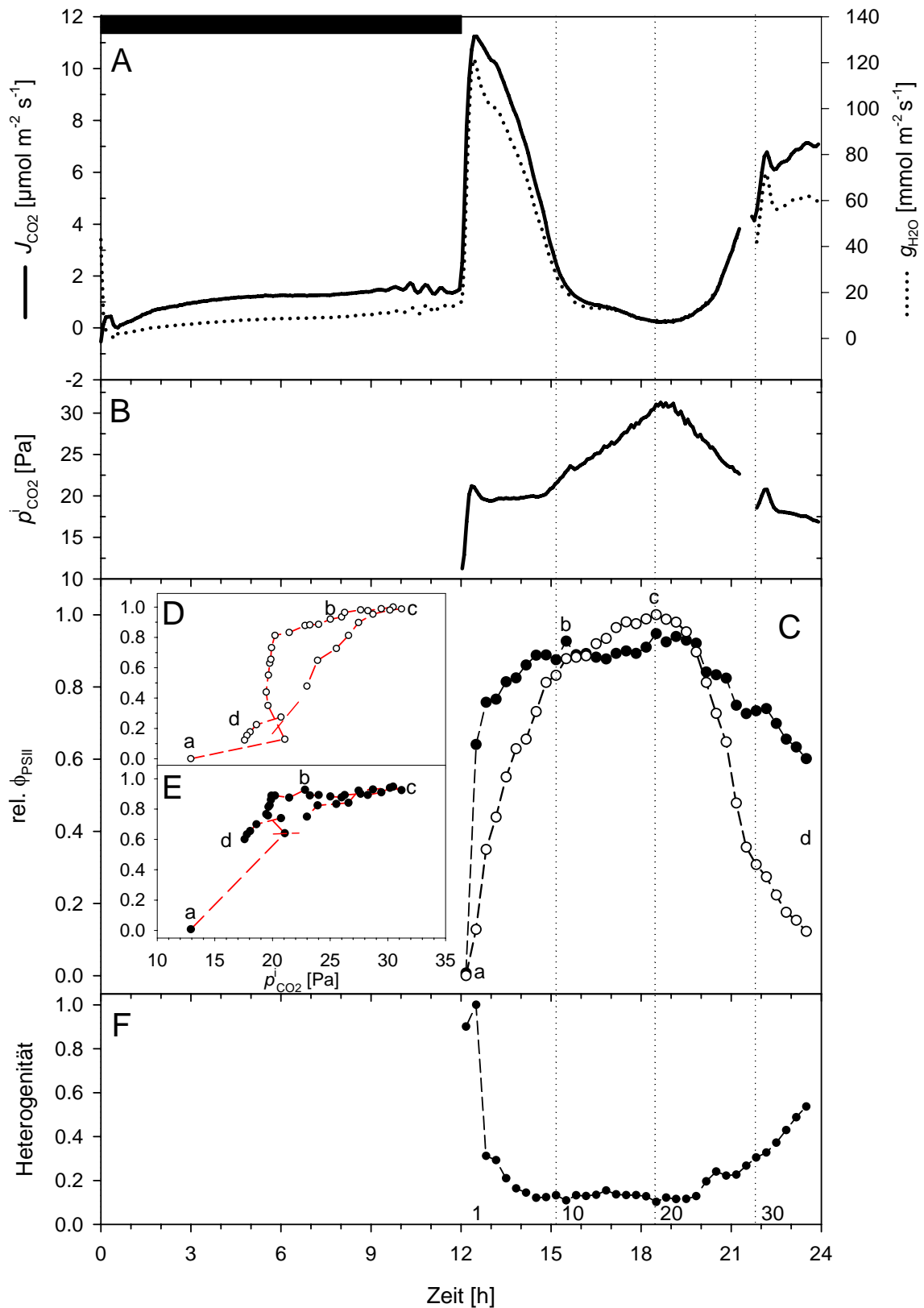
**Abb. 3.4.** Tag/Nacht Rhythmus eines Blattes einer  $C_3$ -adaptierten *C. minor*-Pflanze. A und B) Gaswechselformen ( $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$ ,  $p_{CO_2}^i$ ). C) Relative Quanteneffizienz des PSII in einem Ausschnitt an der Mitte des Blattes (geschlossene Kreise, siehe Abb. 3.5) und in einem Ausschnitt auf dem Hauptleitbündel (geöffnete Kreise, siehe Abb. 3.5). D und E) Korrelation zwischen  $\text{rel. } \phi_{PSII}$  und  $p_{CO_2}^i$  auf dem Hauptleitbündel bzw. Interkostalfeld. F) Zeitverlauf der Heterogenität der  $\text{rel. } \phi_{PSII}$ . Die gestrichelten Linien mit den Zahlen 1, 10, 20, 30 weisen auf die entsprechenden Bilder der relativen Quanteneffizienz des PSII in Abbildung 3.5 hin.



**Abb 3.5.** Relative Quanteneffizienz von PSII eines Blattes einer *C.<sub>3</sub>*-adaptierten *C. minor*-Pflanze während eines Tag/Nacht Rhythmus. Der Zeitabstand zwischen den Abbildungen ist 20 Minuten. Auf der Bildnummer 1 sind die in Abb 3.4 analysierten Ausschnitte dargestellt.

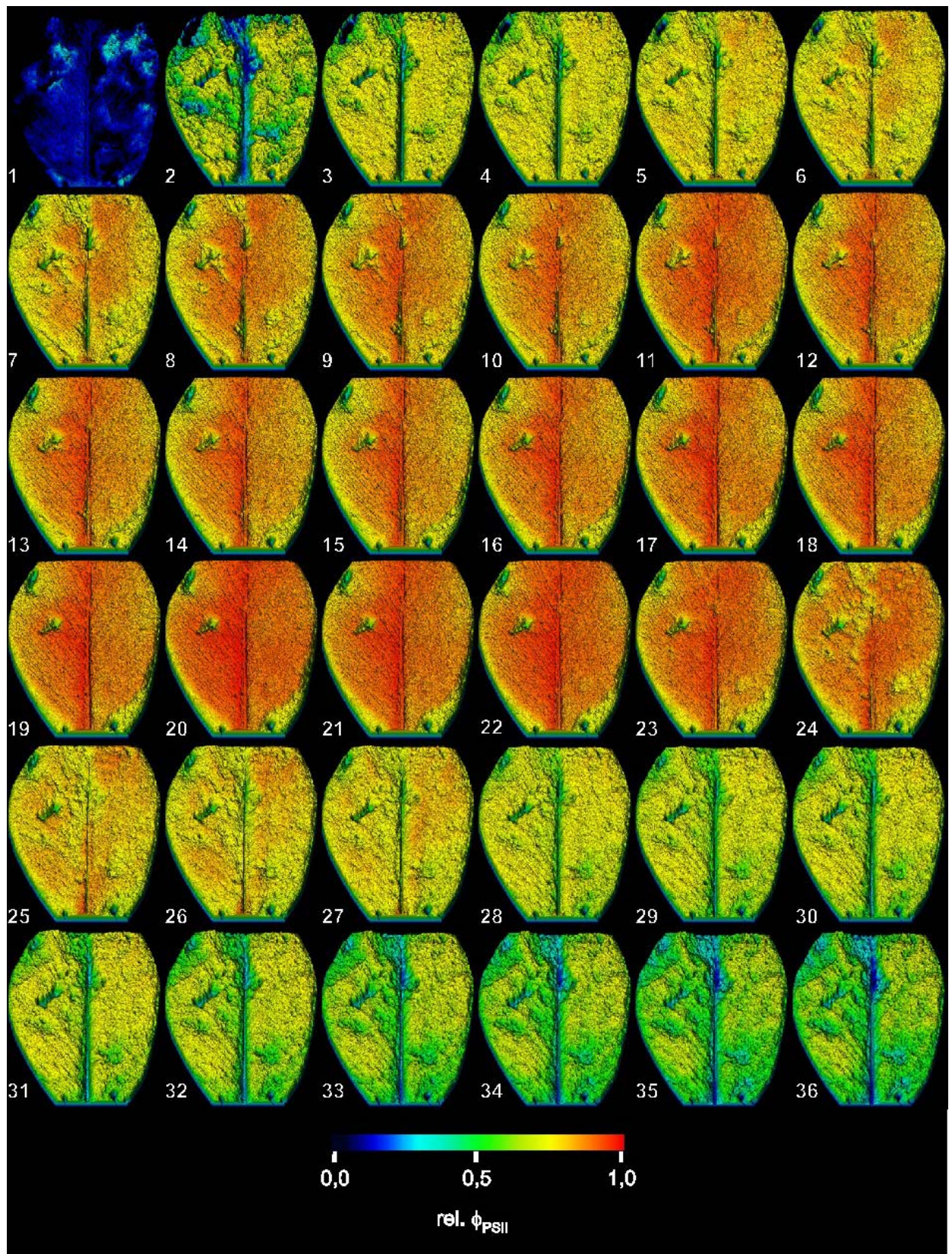


Bei den CAM-adaptierten Pflanzen waren alle vier CAM-Phasen in der Gaswechselanalyse zu erkennen (Abb. 3.6 A, B). Auf dem Interkostalfeld stieg  $\phi_{\text{PSII}}$  in den ersten fünfzig-Minuten, also zu Beginn der Phase II schnell an, gleichzeitig mit  $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $J_{\text{CO}_2}$  und  $p_{\text{CO}_2}^i$ . Der letztere Parameter fiel kurz auf ein *Plateau* ab. Hier wurde auf dem Blatt die maximale Heterogenität im  $\phi_{\text{PSII}}$  beobachtet (Abb. 3.6 F und 3.7). In den folgenden 2 1/2 Stunden während der Phase II sanken  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  und  $J_{\text{CO}_2}$  auf minimale Werte, aber  $p_{\text{CO}_2}^i$  blieb konstant. Das bedeutet, dass die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe nicht durch die Erniedrigung der Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf beeinflusst wurde, sondern, dass die Malat-Dekarboxylierung den photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Bedarf versorgte. Auf dem Interkostalfeld stieg rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  während dieser Zeit noch an und zeigte die Erhöhung des Energiebedarfs für die Photosynthese während der Phase II. Die Heterogenitätswerte erreichten minimale Werte (Abb. 3.6 F und 3.7). Ab diesem Zeitpunkt (Phase III) stieg die interne  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe bis zu ihrem Maximum in der Mitte der Lichtphase an, als die Werte von  $J_{\text{CO}_2}$  und  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  minimal waren. Auf dem Interkostalfeld hat sich  $\phi_{\text{PSII}}$  hier nicht mehr viel verändert. Das Heterogenitätsmaß und die  $\phi_{\text{PSII}}$ -Bilder zeigten eine sehr homogene Verteilung über der Blattspreite (Abb. 3.6 F und 3.7) wie in einer  $\text{C}_3$ -adaptierten Pflanze (Abb. 3.4 F, 3.5). Während der Phase IV (nach 8 Stunden in der Lichtphase) sank  $p_{\text{CO}_2}^i$ , die Stomata öffneten sich wieder, und es wurde  $\text{CO}_2$  aus der Aussenluft fixiert.  $\phi_{\text{PSII}}$  der Interkostalfelder sank wieder auf niedrige Werte. Die Heterogenität von  $\phi_{\text{PSII}}$  auf den Interkostalfeldern erhöhte sich progressiv bis zum Ende der Lichtphase (Abb. 3.6 F und 3.7). Der Kurvenverlauf von  $\phi_{\text{PSII}}$  unterschied sich zwischen dem Bereich der Hauptleitbündel und auf dem Interkostalfeld (Abb. 3.4 C und 3.6 C). Auf den Hauptleitbündeln stieg  $\phi_{\text{PSII}}$  langsamer an als auf dem Interkostalfeld und erreichte etwas höhere Werte in der Mitte der Lichtphase, wie in den  $\text{C}_3$ -adaptierten Pflanzen, und fiel dann am Ende der Lichtphase wieder zu niedrigeren Werten ab. Insgesamt waren die Schwankungen im  $\phi_{\text{PSII}}$  auf den Hauptleitbündeln stärker als auf dem Interkostalfeld. Die Abhängigkeit des  $\phi_{\text{PSII}}$  von  $p_{\text{CO}_2}^i$  zeigte ein komplexeres Muster als bei den  $\text{C}_3$ -adaptierten Pflanzen. Hier waren die CAM-Phasen II, III und IV erkennbar. In der Phase II war  $p_{\text{CO}_2}^i$  konstant, und die Erhöhung des  $\phi_{\text{PSII}}$  bedeutet eine progressive Erhöhung des Energiebedarfs. Auf den Hauptleitbündeln war diese Phase langsamer als auf dem Interkostalfeld (Abb. 3.6 C). Während der Phase III war  $\phi_{\text{PSII}}$  auf dem Interkostalfeld stabil, stieg aber noch auf den Hauptleitbündeln kurz an und erreichte die höchsten Werte. Die Abhängigkeit des  $\phi_{\text{PSII}}$  von  $p_{\text{CO}_2}^i$  war besonders in der Phase IV merkbar und war auf den Hauptleitbündeln stärker als auf dem Interkostalfeld.



**Abb. 3.6.** Tag/Nacht Rhythmus eines Blattes einer CAM-adaptierten *C. minor*-Pflanze. A und B) Gaswechsellparameter ( $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$ ,  $p_{CO_2}^i$ ). C) Relative Quanteneffizienz des PSII in einem Ausschnitt an der Mitte des Blattes (geschlossene Kreise, siehe Abb. 3.7) und in einem Ausschnitt auf dem Hauptleitbündel (geöffnete Kreise, siehe Abb. 3.7). D) und E) Korrelation zwischen  $\text{rel. } \phi_{PSII}$  und  $p_{CO_2}^i$  auf dem Interkostalfeld bzw. Hauptleitbündel. Hier bezeichnen die kleinen Buchstaben die Zeitpunkte von Diagramm C. F) Zeitverlauf der Heterogenität der  $\text{rel. } \phi_{PSII}$ . Die gestrichelten Linien mit den Zahlen 1, 10, 20 und 30 weisen auf Abbildungsnummern der relativen Quanteneffizienz des PSII in Abbildung 3.7 hin.





**Abb3.7.** Relative Quanteneffizienz von PSII eines Blattes einer CAM-adaptierten *C. minor*-Pflanze während eines Tag/Nacht Rhythmus. Der Zeitabstand zwischen den Abbildungen ist 20 Minuten. Auf der Bildnummer 1 sind die in Abb 3.4. analysierten Ausschnitte dargestellt. Die Abbildung Nummer 13 zeigt eine kleine Verletzung.

### 3.2.3 Photorespiratorische Aktivität in C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen

Die Anwendung einer luftähnlichen Gasmischung, die 1% O<sub>2</sub> enthielt, ermöglichte durch Gaswechselfmessungen und Bilder der Chlorophyllfluoreszenz die Quantifizierung der photorespiratorischen Aktivität in der photosynthetischen Reaktion im Tagesgang und Dauerlicht in *C. minor*. Eine zwanzigminütige Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub> wurde viermal während der Lichtphase benutzt. Die Abb. 3.8 und 3.10 zeigen je einen repräsentativen Versuch aus drei Wiederholungen. Die Kurvenverläufe des normalen Tagesgangs in den Gaswechselfparametern ( $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$  und  $p_{CO_2}^i$ ) und in der Chlorophyllfluoreszenz von C<sub>3</sub>- und CAM-adaptierten Pflanzen werden dargestellt. Die Abb. 3.9 und 3.11 stellen die Bilder von  $\phi_{PSII}$  dar, die erhalten wurden, während die Tagesgänge aufgenommen wurden. Die Umschaltung von normaler Luft zu Luft mit 1% O<sub>2</sub> und *vice versa* produzierte immer einen Messartefakt, dessen Dauer nicht länger als 4 Minuten war. Die Daten dieser Zeit wurden von den Diagrammen entfernt.

Die erste Umschaltung von normaler Luft (etwa 20% O<sub>2</sub>) zur Gasmischung mit 1 % O<sub>2</sub> in den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen erfolgte 1,5 Stunden nach Beginn der Lichtphase. Ein paar Sekunden zuvor wurde eine Abbildung des  $\phi_{PSII}$  aufgenommen. Sofort nach der Umschaltung stieg  $J_{CO_2}$ , und sank  $p_{CO_2}^i$  schnell, aber  $g_{H_2O}$  stieg langsamer. Das bedeutet, dass die photorespiratorische Aktivität der RUBISCO unter dieser Bedingung schnell stark gehemmt wurde und die Erhöhung der Carboxylase-Aktivität die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blattgewebe verringerte.

Die Stomata antworteten langsamer auf die Applikation der Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub>. Die Kurvenverläufe der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf weisen darauf hin, dass diese Antwort wahrscheinlich nicht auf der niedrigen Sauerstoffkonzentration selbst beruht, sondern auf der Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blattgewebe. Die langsame Erhöhung von  $g_{H_2O}$  verursachte eine weitere Erhöhung der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme während der Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub>. Dies zeigt, dass die maximale Carboxylierungsrate der RUBISCO abhängig von der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf ist.

Nach 20 Minuten unter 1% O<sub>2</sub> war die Nutzung der Lichtenergie durch die photosynthetischen Reaktionen (rel.  $\phi_{PSII}$ ) auf dem ganzen Blatt geringer als unter normaler Luft und die räumliche Verteilung der Nutzung der Lichtenergie wesentlich heterogener. Dies zeigte, dass die Carboxylase- und die photorespiratorische Aktivität in C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen von *C. minor* räumlich heterogen

waren. Eigentlich hatte die photorespiratorische Aktivität eine stabilisierende Wirkung auf die Energienutzung der Lichtreaktionen, wo die RUBISCO-Carboxylase-Aktivität heterogen war.

Nach Zurückschaltung zu normaler Luft sank  $J_{\text{CO}_2}$ , und  $p_{\text{CO}_2}^i$  stieg wieder an. Die Stomata reagierten auf die Erhöhung von  $p_{\text{CO}_2}^i$ , und die Werte von  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  sanken langsamer. Dabei hatte die stomatäre Leitfähigkeit einen geringfügigen Einfluss auf  $J_{\text{CO}_2}$  und  $p_{\text{CO}_2}^i$ . Das Heterogenitätsmaß sank wieder zu den normalen Werten.

Die folgenden drei Applikationen der Gasmischung mit 1%  $\text{O}_2$  führten zur Wiederholung der gleichen oben beschriebenen Prozesse. Die maximale photorespiratorische Aktivität unterschied sich aber und war etwas kleiner bei der ersten und letzten Applikation. Die prozentuale photorespiratorische Aktivität zeigte auch die gleiche Tendenz mit Werten von 33,7%, 35,0%, 35,7 und 32,1% bei den vier aufeinander folgenden Applikationen von 1%  $\text{O}_2$ . Unterschiedlich waren auch die Abbildungen des  $\phi_{\text{PSII}}$  unter 1%  $\text{O}_2$ . Die Nutzung von Lichtenergie zur photorespiratorischen Aktivität war wesentlich größer am Anfang und am Ende der Lichtphase.

Applikationen von Luft mit 1 %  $\text{O}_2$  wurden während der Phasen II, III und IV einer CAM-adaptierten Pflanze benutzt. Während der Phase II wurde die Gasmischung mit 1 %  $\text{O}_2$  appliziert, wenn  $J_{\text{CO}_2}$  und  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  noch am ansteigen waren. Wenn durch 1 %  $\text{O}_2$  die photorespiratorischen Bedingungen ausgeschlossen waren, stiegen die Werte von  $J_{\text{CO}_2}$ ,  $g_{\text{H}_2\text{O}}$  und  $p_{\text{CO}_2}^i$  noch weiter, und die rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  sank. Die Erhöhung der internen  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe ( $p_{\text{CO}_2}^i$ ) unter nicht photorespiratorischen Bedingungen während der Phase II zeigte den Beginn interner  $\text{CO}_2$ -Produktion durch Decarboxylierung organischer Säure an. Der niedrigere rel.  $\phi_{\text{PSII}}$ -Wert weist auf die Nutzung von Lichtenergie zur photorespiratorischen Aktivität trotz der Erhöhung der internen  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe hin. Dies ist ein Indiz dafür, dass die  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismen die photorespiratorische Aktivität nicht behindern können. Die photorespiratorische Aktivität entsprach in dieser Phase 15,6% der maximalen Carboxylierungsrate. Das Heterogenitätsmaß sank unter normaler Luft (Abb. 3.10) während des Übergangs von Phase II zu III. Die Applikation der Gasmischung mit 1 %  $\text{O}_2$  hat diese Tendenz nicht geändert.



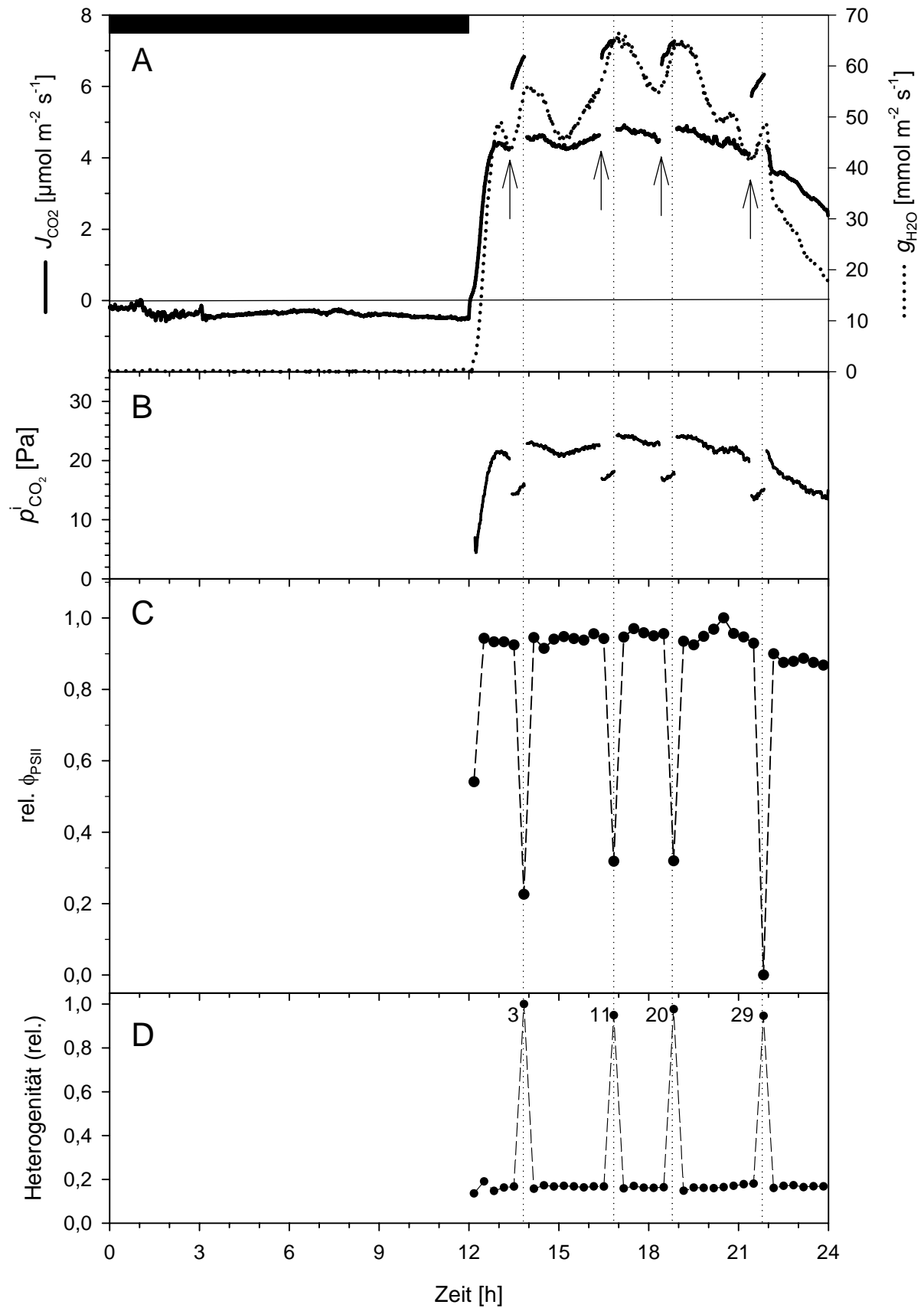


Abb. 3.8. Tag/Nacht Rhythmus eines Blattes einer  $C_3$ -adaptierten *C. minor*-Pflanze mit Applikation von Luft mit 1% Sauerstoff. Die gestrichelten Linien bezeichnen das Ende der 20-minütigen Applikation von Luft mit 1%  $O_2$ . A und B) Gaswechselfparameter ( $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$ ,  $p_{CO_2}^i$ ). C) Relative Quanteneffizienz des PSII in einem Ausschnitt auf der Mitte des Blattes (geschlossene Kreise, siehe Abb. 3.9). D) Zeitverlauf der Heterogenität der rel.  $\phi_{PSII}$ . Hier bezeichnen die Nummern die Bilder der rel.  $\phi_{PSII}$  in Abb. 3.9.

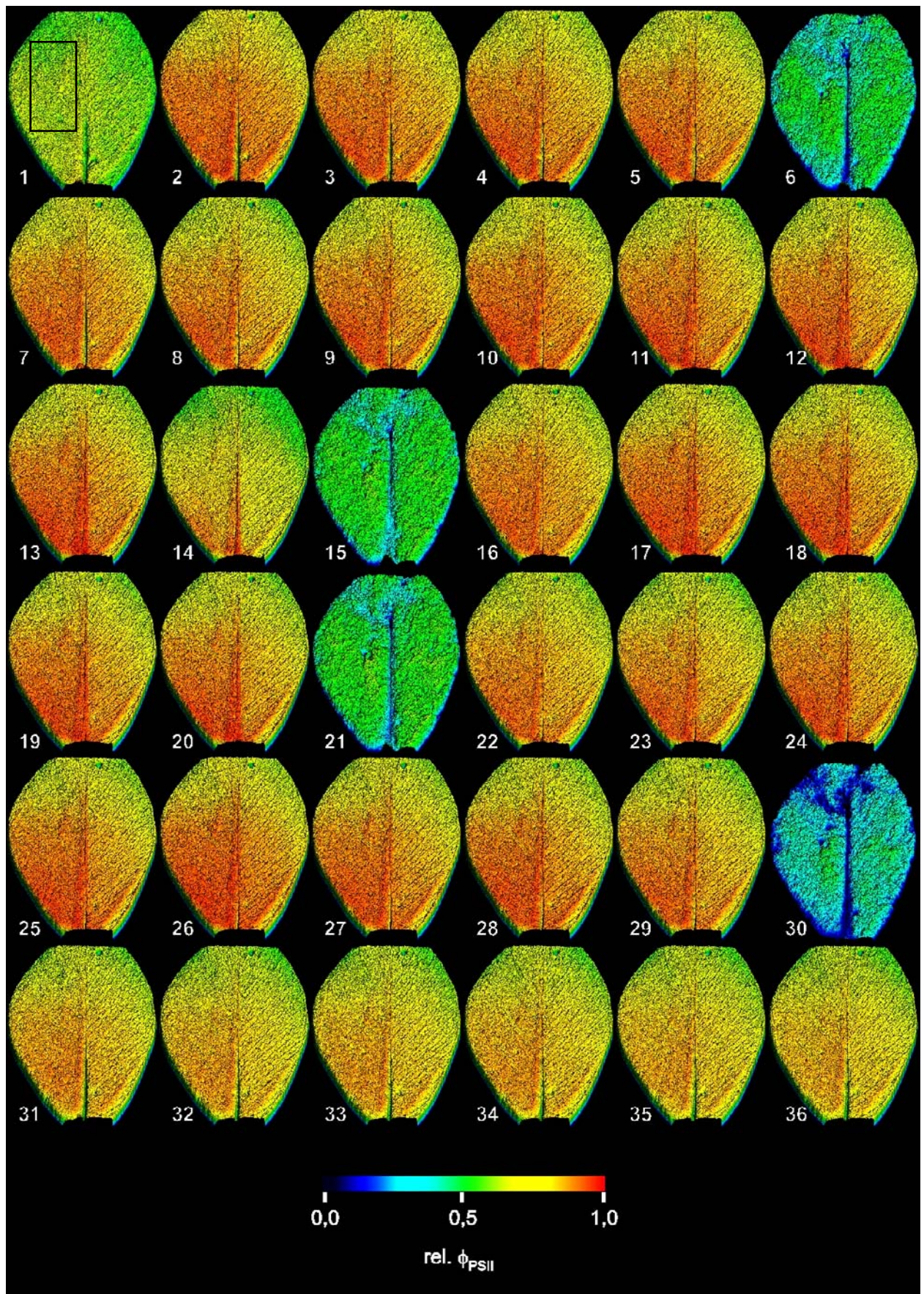


Abb. 3.9. Relative Quanteneffizienz des PSII eines Blattes einer *C. minor*-Pflanze während eines Tag-/Nacht-Rhythmus mit Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub> (Pfeile). Auf dem Bild Nummer 1 ist der analysierte Ausschnitt dargestellt. Die Bilder Nummer 3, 11, 20 und 29 wurden unter der Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub> gemacht. Der Zeitabstand zwischen den Abbildungen ist 20 Minuten.



Während der Phase III haben die Applikationen von Luft mit 1 % O<sub>2</sub> fast nichts bewirkt. Alle gemessenen Parameter zeigten fast keine Änderung. Die stomatäre Leitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) war sehr gering. Der stomatäre Widerstand hat das Blatt fast ganz abgedichtet. Die photorespiratorische Aktivität konnte deswegen nicht bestimmt werden. Bei einer leichten Änderung des Heterogenitätsmaßes zeigen die Bilder 11 und 20 der Abb. 3.11, dass die Effekte nur am Rande des Blattes zu beobachten waren, und wahrscheinlich waren diese Stellen für die geringfügigen Werte von  $g_{H_2O}$  und  $J_{CO_2}$  verantwortlich.

Die beiden Applikationen von Luft mit 1 % O<sub>2</sub> während der Phase IV stellten ein ähnliches Muster wie bei einer C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanze dar, d. h.,  $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$  und das Heterogenitätsmaß stiegen und  $p_{CO_2}^i$  und  $\phi_{PSII}$  sanken. Während der Applikation der Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub> am Anfang der Phase IV zeigten aber die Werte von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  einen steilen Anstieg als Folge der normalen Erhöhung dieser Parameter während dieser Phase (Abb. 3.10). Aber die prozentuale photorespiratorische Aktivität zeigte Werte von 37,9% und 17,6% für den Anfang bzw. das Ende der Phase IV.

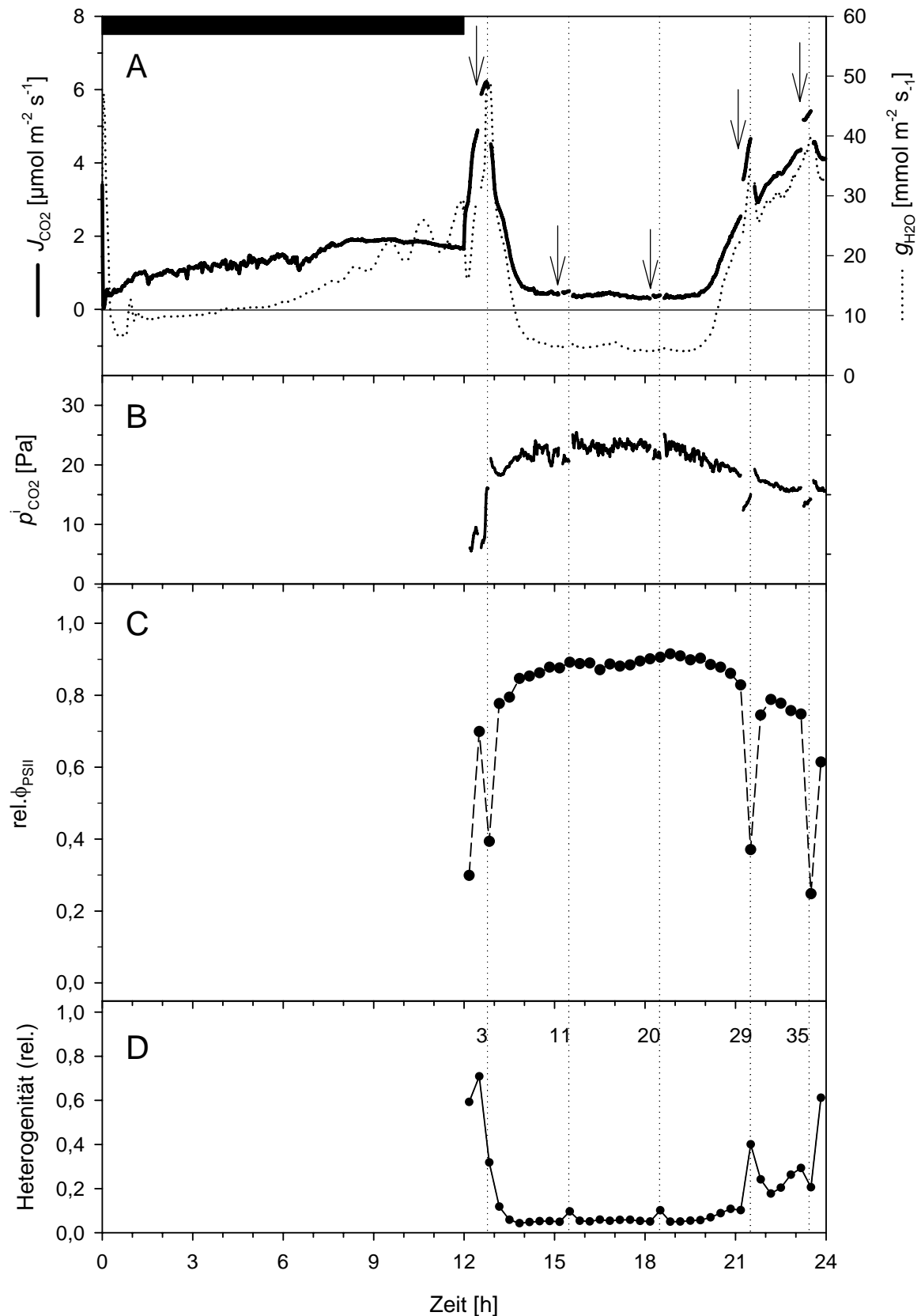


Abb. 3.10. Tag/Nacht Rhythmus eines Blattes einer CAM-adaptierten *C. minor*-Pflanze mit Applikation von Luft mit 1%  $O_2$  (Pfeile). Die gestrichelten Linien bezeichnen das Ende der 20-minütigen Applikation von Luft mit 1%  $O_2$ . A und B) Gaswechsellparameter ( $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$ ,  $p_{CO_2}^j$ ). C) Relative Quanteneffizienz des PSII in einem Ausschnitt an der Mitte des Blattes (geschlossene Kreise, siehe Abb. 3.11). D) Zeitverlauf der Heterogenität der  $\text{rel. } \phi_{PSII}$ . Hier bezeichnen die Nummern die Bilder der  $\text{rel. } \phi_{PSII}$  in Abbildung 3.11.

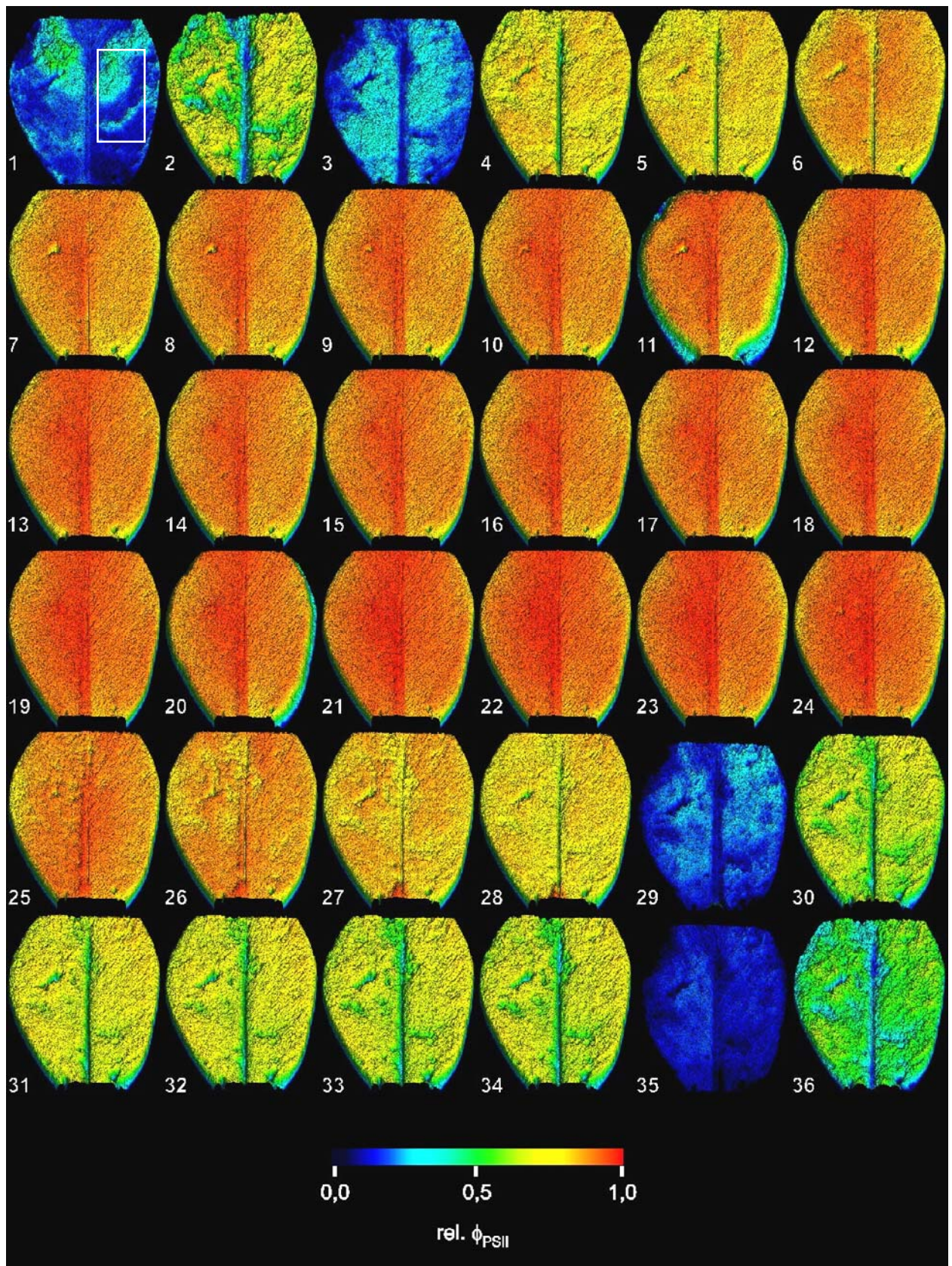


Abb. 3.11. Relative Quanteneffizienz des PSII eines Blattes einer CAM-adaptierten *C. minor*-Pflanze während eines Tag-/Nacht-Rhythmus mit Applikation von Luft mit 1%  $\text{O}_2$ . Auf der Bild Nummer 1 ist der analysierte Ausschnitt dargestellt. Die Bilder Nummer 3, 11, 20, 29 und 35 wurden unter der Applikation von Luft mit 1%  $\text{O}_2$  gemacht. Der Zeitabstand zwischen den Abbildungen ist 20 Minuten.

### 3.3 Analyse des endogenen Rhythmus im Dauerlicht

#### 3.3.1 Einfluss der Temperatur auf den endogenen Photosynthese-Rhythmus in *C. minor*.

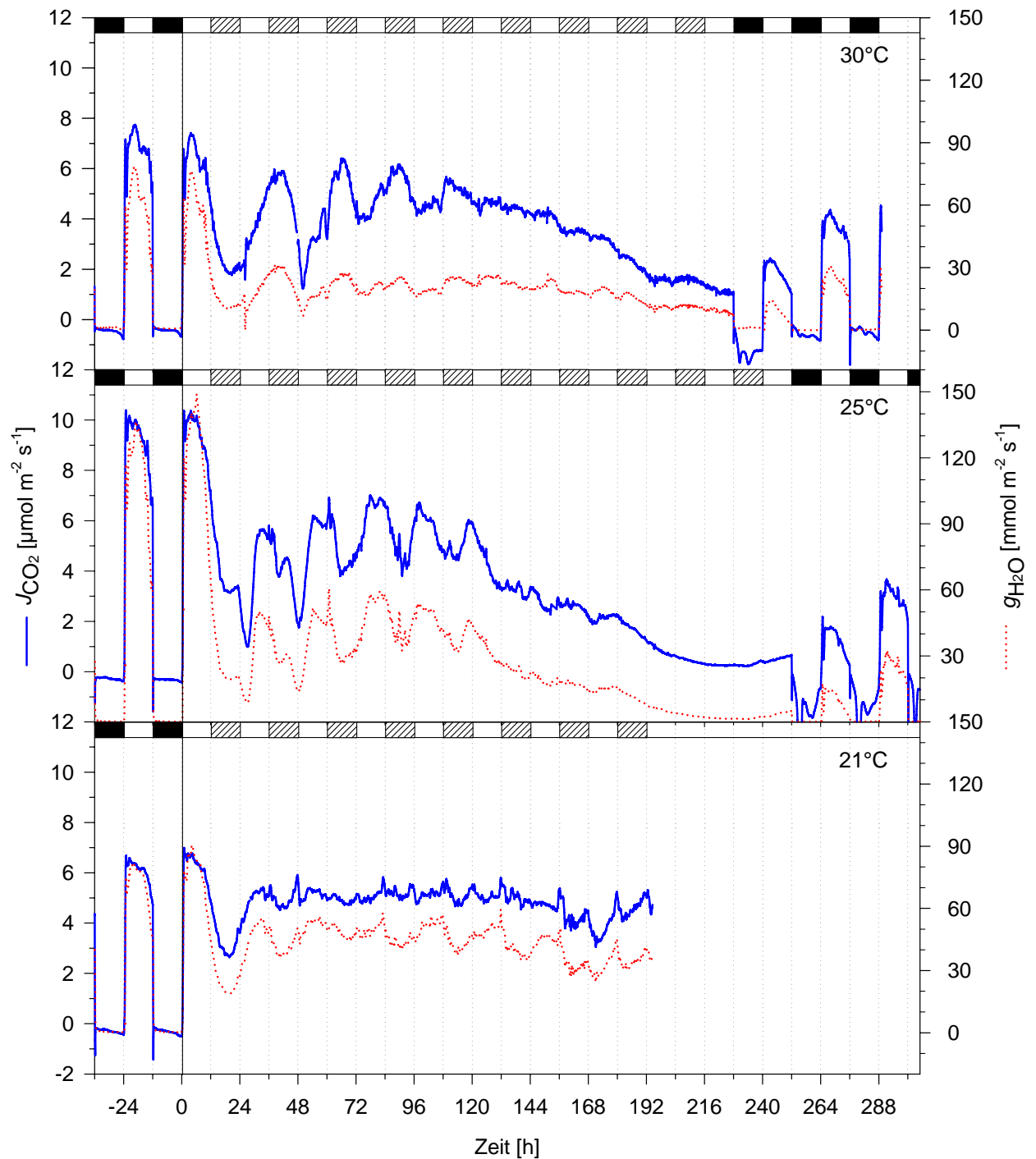
Die Messungen des photosynthetischen Verhaltens (Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenzmessungen) unter konstanten Bedingungen im Dauerlicht zeigen die zyklischen Prozesse der Photosynthese auf. Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des endogenen Rhythmus von *C. minor* wurden dieselben drei Temperaturen ausgewählt, die für die Tagesganganalyse benutzt wurden (Kap. 3.2.1). Die Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ) und die Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ) bei 21°C, 25°C und 30°C sind in den Abbildungen (Abb. 3.12 und 3.13. für C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierte Pflanzen dargestellt. Die Lichtintensität lag bei allen Versuchen um  $120 \pm 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Der circadiane oszillatorische Verlauf von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  wurde bei den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen bei 25°C und 30°C im Dauerlicht deutlich beobachtet. Die Oszillationen starben aber immer aus. Bei 25°C war das rhythmische Verhalten im Dauerlicht stärker ausgeprägt als bei 30°C. Arrhythmisches Verhalten wurde für  $J_{CO_2}$  bei 21°C beobachtet, aber  $g_{H_2O}$  zeigte hier auch eine leichte circadiane oszillatorische Tendenz. Bei 30°C und 25°C wurde nach dem Aussterben des Rhythmus der externe Dunkel/Licht-Wechsel wieder hergestellt. Das dann erscheinende Gaswechsellmuster entsprach noch den von C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen, d. h., mit negativer Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate in den Dunkelphasen.

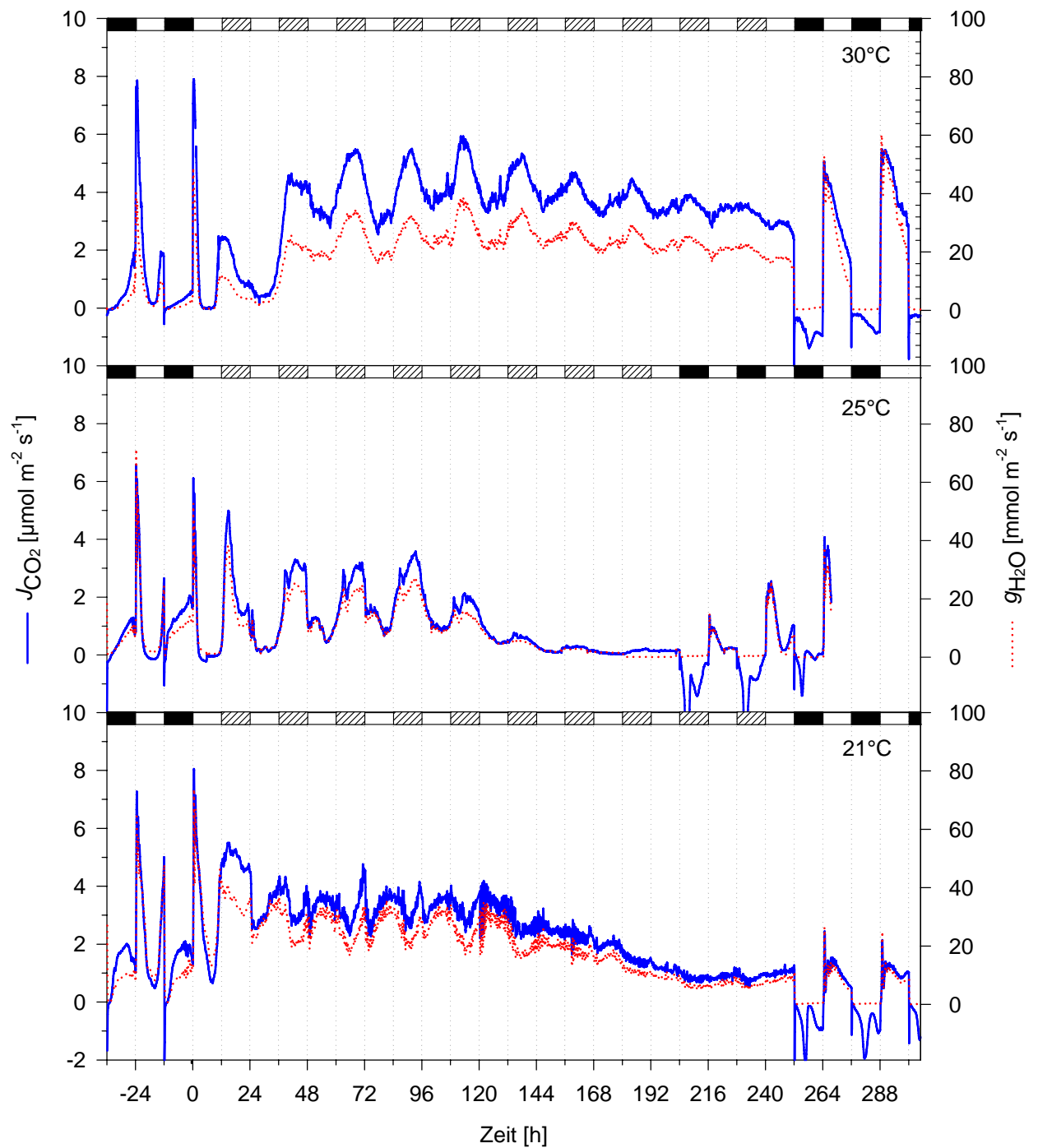
Die CAM- adaptierten Pflanzen zeigten im Dauerlicht bei allen drei Versuchstemperaturen circadianes rhythmisches Verhalten. Aber, wie bei den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen, starb der Rhythmus mit der Zeit im Dauerlicht aus. Die Schwankungen bei 21°C waren unregelmäßig, mit relativ kleinen Amplituden. Bei 25°C waren vier Perioden deutlich erkennbar mit der größten Amplitude von allen 3 Versuchstemperaturen. Bei 30°C wurden mehr als 7 Perioden beobachtet. Interessanterweise waren die CAM-adaptierten Blätter nach der Rücker zu Dunkel/Licht-Bedingungen im C<sub>3</sub>-Zustand. D.h., unter Dauerlicht schalten die Pflanzen zum C<sub>3</sub>-photosynthetischen Modus zurück.

Im Vorliegen von erkennbaren Oszillationen bei 21°C in CAM- adaptierten Pflanzen, das in C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen nicht beobachtet wurden, besteht ein interessanter Kontrast zwischen den endogenen Rhythmen der C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen.





**Abb. 3.12.** Gaswechsel von  $C_3$ -adaptierten Pflanzen von *C. minor* bei drei unterschiedlichen Temperaturen: 21, 25 und 30 °C. Die Lichtintensität war  $120 \pm 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Netto- $\text{CO}_2$ -Austauschrate ( $J_{\text{CO}_2}$  - blaue Linie) und die Blattfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$  - rote Linie) sind gezeigt. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelphasen, helle Balken die Lichtphasen und die schraffierten Balken die subjektiven Dunkelphasen im Dauerlicht.



**Abb. 3.13.** Gaswechsel von CAM-adaptierten Pflanzen von *C. minor* bei drei unterschiedlichen Temperaturen: 21, 25 und 30 °C. Die Lichtintensität war  $120 \pm 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{\text{CO}_2}$  - blaue Linie) und die Blattfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$  - rote Linie) sind gezeigt. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelphasen, helle Balken die Lichtphasen und die schraffierten Balken die subjektiven Dunkelphasen im Dauerlicht.



Die Tabelle 2 enthält Daten, die aus den Diagrammen der Abbildungen 3.12 und 3.13 herausgelesen sind. Sie umfasst die Zeit ab dem Starten der Oszillationen im Dauerlicht (Stunden bis zum ersten Peak nach dem ersten Tiefpunkt) und der beobachteten Perioden während des Dauerlichts (gemessen an den Zeitdifferenzen zwischen den Tiefpunkten). In beiden photosynthetischen Modi beeinflusste die Temperatur den Start der Rhythmik. Je höher die Temperatur war, desto länger dauerte es, bis die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme den ersten Peak erreichte. Bei den CAM adaptierten Pflanzen dauerte dies länger als bei den  $\text{C}_3$ -adaptierten Pflanzen. Nach dem ersten Peak zeigten beide photosynthetischen Modi eine Tendenz, zur Temperaturkompensation. Die Tag/Nacht-Adaptationsperiode (24h) hatte sich wieder eingespielt, obwohl bei den  $\text{C}_3$ - adaptierten Pflanzen die Abweichung etwas größer war.

Tabelle 2: Startzeit und Perioden der Rhythmik bei  $\text{C}_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen.

Temperatur	<b><math>\text{C}_3</math>-adaptierte Pflanze</b>		<b>CAM- adaptierte Pflanze</b>	
	<i>Stunden bis zum ersten Peak</i>	<i>beobachtete Perioden</i>	<i>Stunden bis zum ersten Peak</i>	<i>beobachtete Perioden</i>
30°C	38	24 / 24 / 24 / 25	39	25 / 24 / 24 / 23 / 24
25°C	33	21 / 20 / 24 / 24	38	24 / 24 / 24 / 24
21°C	30	23	36	24 / 24 / 24

### 3.3.2 Endogener Rhythmus bei 25°C in $\text{C}_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen im Detail

Die effektive Quanteneffizienz des PSII ( $\Delta F/\text{Fm}'$ ) wurde in den Versuchen bei 25°C mit  $\text{C}_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13) im Dauerlicht alle 20 Minuten gemessen. Da die Lichtintensität während des Versuches immer konstant war, deuten Schwankungen von  $\Delta F/\text{Fm}'$  Änderungen in der Energienutzung der Lichtreaktionen an. Die Ergebnisse werden in den Abb. 3.14 und 3.15 zusammen mit den Gaswechselfparametern ( $J_{\text{CO}_2}$ ,  $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $p_{\text{CO}_2}^i$ ) gezeigt. Die interne  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Blattgewebe wurde zusätzlich analysiert. Die Faseroptik der PAM 101-103 erfasste das Signal der Chlorophyllfluoreszenz vom Mittelteil des Blattes einschließlich des Interkostalfeldes und des Hauptleitbündels.

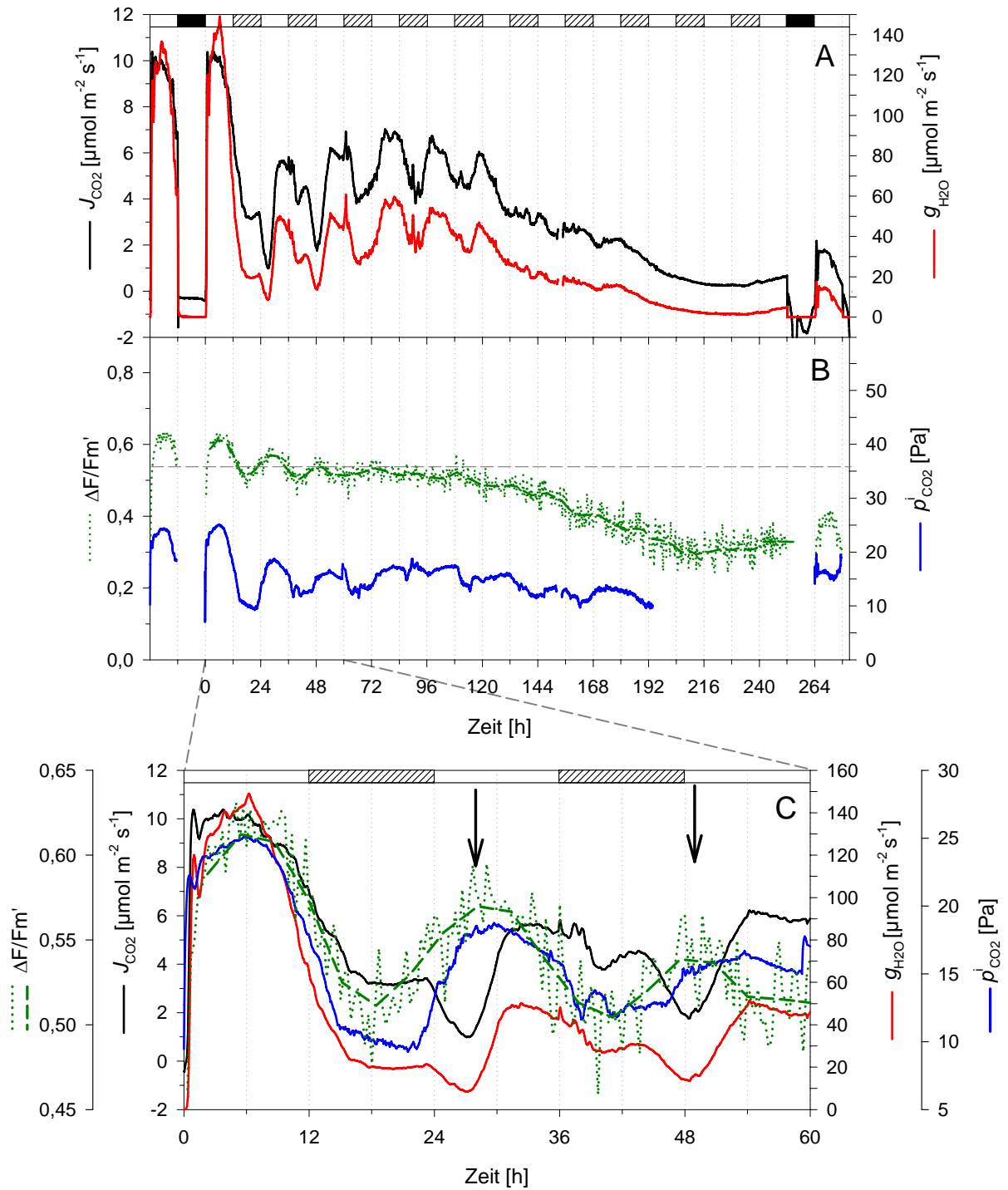
Die Schwankungen von  $\Delta F/\text{Fm}'$  im Dauerlicht hatten in der CAM- adaptierten Pflanze eine deutliche höhere Amplitude und hielten länger an (96 Stunden) als in der  $\text{C}_3$ -adaptierten Pflanze (60 Stunden) (Abbildung 3.14 und 3.15). Die Schwankungen von  $\Delta F/\text{Fm}'$  starben aber für beide Pflanzen schneller aus als die Schwankungen von  $J_{\text{CO}_2}$ ,  $g_{\text{H}_2\text{O}}$ .

Das Aussterben des Rhythmus von Gaswechselfparametern im Dauerlicht war bei dieser Temperatur bei beiden photosynthetischen Zuständen mit einer Erniedrigung von  $\Delta F/F_m'$  gekoppelt. Die beobachtete Erniedrigung der stomatären Leitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) war wahrscheinlich die Ursache für die geringe Netto- $CO_2$  Aufnahme ( $J_{CO_2}$ ) und interne  $CO_2$ -Konzentration im Blattgewebe ( $p_{CO_2}^i$ ), die die Nutzung der Energie der Lichtreaktionen beeinflussten.

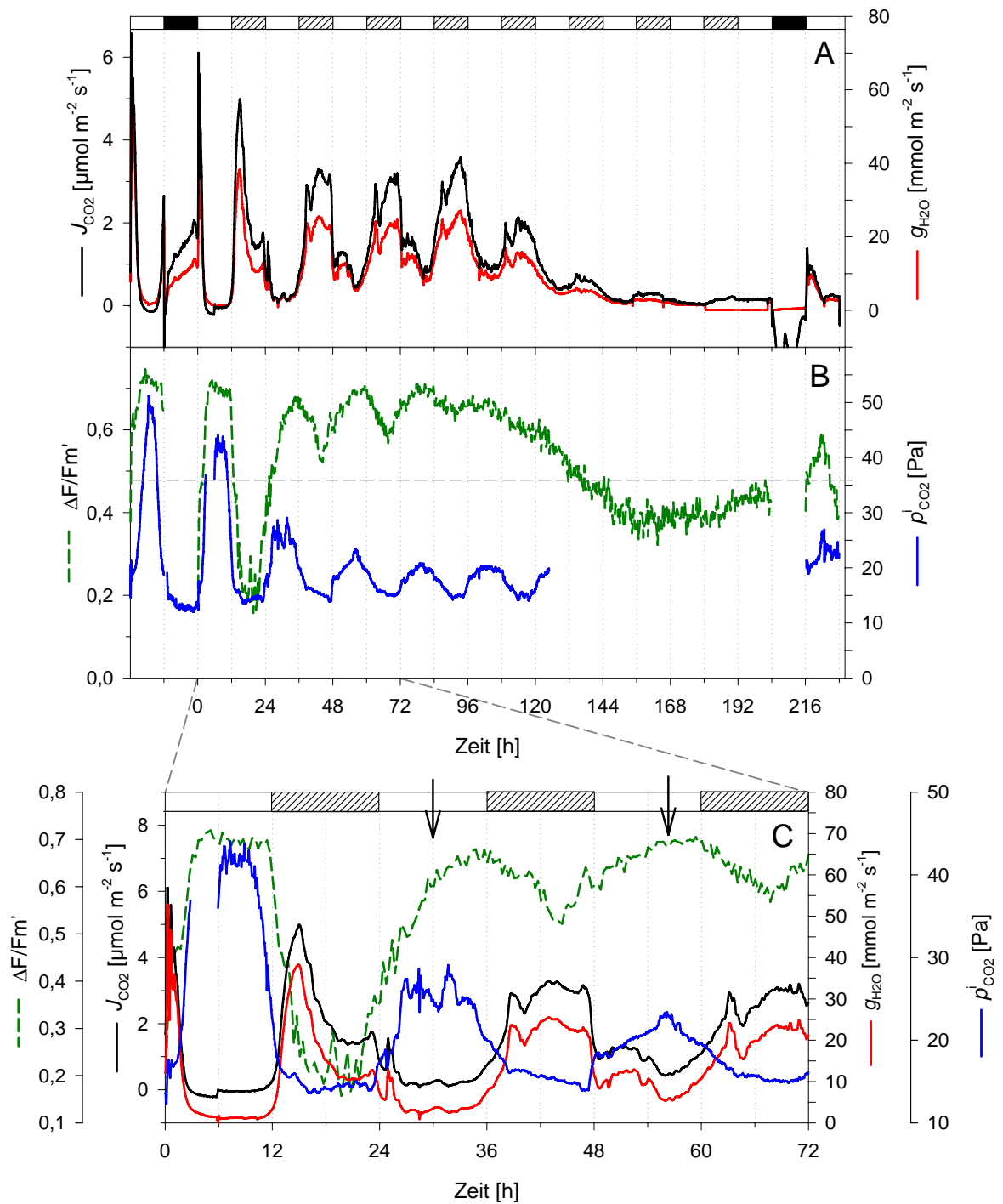
Alle vier gemessenen Parameter werden für die Zeit, solange die oszillatorischen Perioden des  $\Delta F/F_m'$  anhielten, im Detail in Abbildung 3.13 C (erste 60 Stunden) und 3.14 C (erste 72 Stunden) gezeigt. Hier kann man für die  $C_3$ -adaptierte Pflanze feststellen, dass während der ersten achtundvierzig Stunden die Änderungen in  $\Delta F/F_m'$  den Änderungen in  $p_{CO_2}^i$  folgen. D. h., die Energienutzung in den photosynthetischen Reaktionen war höher, wenn mehr internes  $CO_2$  zu Verfügung stand. Interessanterweise wurde der Anstieg von  $\Delta F/F_m'$  und  $p_{CO_2}^i$  zusammen mit der Reduktion von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  zweimal beobachtet (Pfeile in der Abbildung 3.14 C). Dies weist auf eine Erhöhung der internen  $CO_2$ -Konzentration im Blattgewebe unabhängig von der Diffusion von  $CO_2$  durch die Stomata hin. Es lässt uns daran denken, dass Malat mobilisiert wurde und die Erhöhung der internen  $CO_2$ -Konzentration im Blattgewebe erzeugte. Trotz der Adaptation zur  $C_3$ -Photosynthese zeigte *C. minor* im Dauerlicht noch Eigenschaften des CAM, die während des Hell/Dunkel-Rhythmus (Kap. 3.1) nicht im Gaswechsel und bei der Säureanalyse beobachtbar waren.

Bei der CAM- adaptierten Pflanze waren die  $\Delta F/F_m'$ - Werte während der ersten 35 Stunden im Dauerlicht direkt mit  $p_{CO_2}^i$  und umgekehrt mit  $J_{CO_2}$  korreliert. Das entspricht dem, was für eine CAM- adaptierte Pflanze zu erwarten war, nämlich dass während der Mobilisierung von Säure (Malat)  $p_{CO_2}^i$  stieg und  $g_{H_2O}$  sowie  $J_{CO_2}$  sanken. Danach war die Kopplung von  $\Delta F/F_m'$  mit  $p_{CO_2}^i$  nicht mehr so eng. Die Peaks von  $p_{CO_2}^i$  hatten eine deutliche Tendenz zur Reduktion, was auf eine Tendenz der Schwächung des  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus hinweist.

Ferner wurde sowohl in der CAM- adaptierten Pflanze als auch in der  $C_3$ -adaptierten Pflanze der größte Anstieg in  $\Delta F/F_m'$  beim Übergang von der Lichtphase zur ersten subjektiven Nacht im Dauerlicht beobachtet, wenn man nur den rhythmischen Bereich im Dauerlicht betrachtet. Die starke Erniedrigung der Nutzung von Energie der Lichtreaktionen während der ersten subjektiven Nacht könnte stark mit der Aktivität der Carboxylasen (RUBISCO und PEPC) korreliert sein.



**Abb. 3.14.** Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz einer  $C_3$ -adaptierten Pflanze von *C. minor* bei 25°C und einer Lichtintensität von  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ) und Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ). (B)  $p_{CO_2}^i$  und  $\Delta F/Fm'$ . Die horizontale Linie zeigt den erwarteten CO<sub>2</sub>-Partialdruck der Luft. (C) Alle vier Parameter in den ersten 60 Stunden im Dauerlicht. Die Pfeile weisen auf die hohen Werte von  $p_{CO_2}^i$  und  $\Delta F/Fm'$  bei gleichzeitig niedrigen Werten von  $g_{H_2O}$  und  $J_{CO_2}$  hin.



**Abb 3.15.** Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz einer CAM- adaptierten Pflanze von *C. minor* bei 25°C und einer Lichtintensität von  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Netto-CO<sub>2</sub>-Austauschrate ( $J_{CO_2}$ ) und Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ). (B)  $p_{CO_2}$  und  $\Delta F/Fm'$ . Die horizontale Linie zeigt den erwarteten CO<sub>2</sub>-Partialdruck der Luft. (C) Alle vier Parameter in den ersten 72 Stunden im Dauerlicht. Die Pfeile weisen auf die hohe Werte von  $p_{CO_2}$  und  $\Delta F/Fm'$  bei gleichzeitig niedrigen Werten von  $g_{H_2O}$  und  $J_{CO_2}$  hin.

### 3.3.3 Die Beobachtung des endogenen Rhythmus bei *C. minor* mit Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub>

Die Nutzung von Luft mit 1% Sauerstoff ermöglichte die Analyse der maximalen Carboxylierungsaktivität und der photorespiratorischen Aktivität während des endogenen Rhythmus in *C. minor*. Die photorespiratorische Aktivität wurde in Abb. 3.16 und 3.18 als Rate oder in Relation zur maximalen Carboxylierungsaktivität dargestellt. Zwanzigminütige Applikationen des Gasgemisches mit 1% Sauerstoff wurden regelmäßig alle drei Stunden im Dauerlicht verwandt und ermöglichten die Bestimmung der photorespiratorischen Aktivität in C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen während unterschiedlicher Phasen des endogenen Rhythmus. Bilder der Chlorophyllfluoreszenz wurden synchronisiert mit der Bestimmung der photorespiratorischen Aktivität alle zwanzig Minuten aufgenommen, so dass immer am Ende jeder Applikation von 1% O<sub>2</sub> eine Abbildung der relativen Quanten Effizienz (rel.  $\phi_{PSII}$ ) berechnet wurde. Die Abbildungen 3.16 und 3.18 fassen alle berechneten Parameter dieser Versuche zusammen. Die Abbildungen 3.17 und 3.19 zeigen die Chlorophyllfluoreszenzbilder zu bestimmten Zeitpunkten.

Wie bei den anderen Versuchen im Dauerlicht schwankten die Gaswechselfparameter in C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen rhythmisch (Abb. 3.16 und 3.18). Der endogene Rhythmus von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  starb bei der C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanze schneller aus als bei der CAM- adaptierten Pflanze. Der erste Peak von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  im Dauerlicht ereignete sich bei den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen auch früher (etwa 24 Stunden nach dem Beginn von Dauerlicht) als bei den CAM- adaptierten Pflanzen (etwa 32 Stunden nach dem Beginn von Dauerlicht) (siehe auch Kap. 3.3.2). Die maximale Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme ( $J_{CO_2 \max}$ ) und die photorespiratorische Rate folgten in beiden Fällen dem gleichen Kurvenverlauf wie  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$ . D. h., je höher oder kleiner die Werte von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  waren, desto höher oder kleiner war  $J_{O_2}$ . Unterschiedlich war jedoch das Verhalten der prozentualen Photorespirationsrate (%  $J_{O_2}$ ) zwischen den C<sub>3</sub>- und den CAM- adaptierten Pflanzen. Bei den ersteren hingen die Schwankungen von %  $J_{O_2}$  eng mit den anderen gemessenen Gaswechselfparametern zusammen. Bei den CAM- adaptierten Pflanzen war der Kurvenverlauf von %  $J_{O_2}$  wesentlich komplexer. Der Anstieg dieses Parameters begann, wenn  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  noch niedrig waren, und die höheren Werte wurden während des Übergangs von niedrigen zu höheren Werten von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  erreicht. Bei der C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanze wurde dies nur während der ersten endogenen Oszillation beobachtet. Die Werte von %  $J_{O_2}$  waren für die C<sub>3</sub>- adaptierten Pflanzen kleiner als bei den CAM- adaptierten Pflanzen. Die beobachtete maximale Photorespirationsrate war für die C<sub>3</sub>- adaptierten Pflanzen nicht höher als 35% der maximalen Carboxylierungsrate, während bei den CAM- adaptierten Pflanzen  $J_{O_2}$  in den Peaks ca. 50% der

maximalen Carboxylierungsrate erreichte. Bei dem Aussterben der Rhythmik kamen die Werte von %  $J_{O_2}$  bei der CAM- adaptierten Pflanze denen der  $C_3$ -adaptierten Pflanze nahe.

Die auf dem Interkostalfeld gemessene relative Quanteneffizienz des Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ ) änderte sich im Dauerlicht für die  $C_3$ - und für die CAM- adaptierten Pflanzen nicht, wenn sie unter normaler Luft gemessen wurde. Die gemessenen Punkte der rel.  $\phi_{PSII}$  unter 1%  $O_2$  offenbarten aber das oszillatorische Verhalten der Nutzung von Energie der Lichtreaktionen im Dauerlicht. Das zeigte erstmals, dass die photorespiratorische Aktivität unter schwankendem Energiebedarf einen kompensatorischen Einfluss auf  $\phi_{PSII}$  hat. In beiden photosynthetischen Modi waren die Oszillationen der  $\phi_{PSII}$  unter 1%  $O_2$  mit den Schwankungen von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  in Phase. Diese Oszillationen starben mit intermediären Werten aus. Der  $\phi_{PSII}$  Rhythmus unter 1%  $O_2$  starb bei der  $C_3$ - adaptierten Pflanze schneller aus als bei der CAM- adaptierten Pflanze.

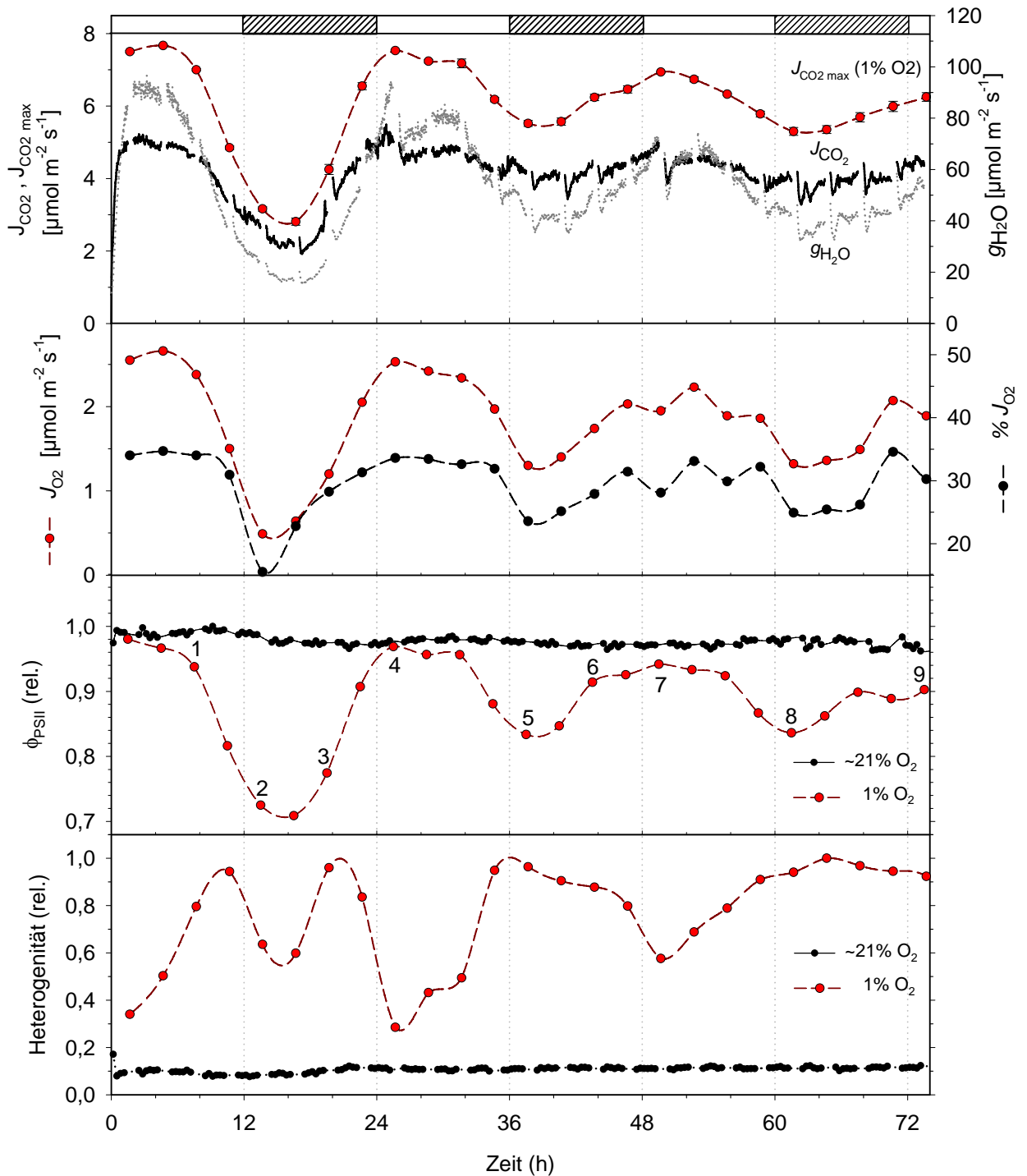
Während der ersten Perioden im Dauerlicht stieg  $\phi_{PSII}$  unter 1%  $O_2$  zu Werten an, die von den Werten unter normaler Luft kaum zu unterscheiden waren. Dies wurde besonders bei den CAM- adaptierten Pflanzen am Beginn der Peaks beobachtet. Es zeigte, dass der Teil der Energie der Lichtreaktionen, der in photorespiratorischer Aktivität verbraucht wurde, zu dem momentan hohen Energiebedarf der anderen photosynthetischen Reaktionen umgeleitet wurde. Das zeigte auch, dass die Konkurrenz zwischen den photosynthetischen Reaktionen und der photorespiratorischen Aktivität um die Energie der Lichtreaktionen in den Peaks war größer als in den Tälern.

Der Zusammenhang zwischen der maximalen Netto- $CO_2$ -Aufnahme und der relativen Quanteneffizienz des Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ ) bei der  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanze (Abb. 3.20) deutet an, dass die Energienutzung der Lichtreaktionen und die maximale Carboxylierungsrate ( $J_{CO_2 \max}$ ) stark korreliert sind, besonderes bei den  $C_3$ -adaptierten Pflanzen ( $r^2=0,96$ ). Dass die Korrelation bei der CAM- adaptierten Pflanze geringer war ( $r^2=0,75$ ), bewies aber, dass bei dieser Adaptation andere Faktoren außer der Carboxylierungsaktivität die Energie-Nutzung der Lichtreaktionen beeinflussen.

Unter Luft mit 1%  $O_2$  im Dauerlicht wurden sowohl für  $C_3$ - und als auch für CAM- adaptierte Pflanzen Schwankungen im Heterogenitätsmaß beobachtet (Abb. 3.16 und 3.18.). Unter normaler Luft waren die Blätter bei beiden Photosynthesemodi in Pflanzen im Dauerlicht sehr homogen. Die regelmäßige Applikation von Luft mit 1%  $O_2$  zeigte für beide Pflanzen oszillatorisches Verhalten der Heterogenität. Bei der CAM- adaptierten Pflanze waren die Schwankungen deutlich stärker als bei der  $C_3$ - adaptierten Pflanze. Die räumliche Struktur veränderte sich mehrmals von einem homogenen in einen

heterogenen Zustand (Abb. 3.18). Am Ende der Dauerlichtperiode zeigten beide Pflanzen eine deutliche Tendenz zu Stabilisierung. Die Amplitude des Heterogenitätsmaßes kann hier zwischen den  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen nicht direkt verglichen werden, weil die Schwankungen auf die Differenz zwischen maximalem und minimalem Wert für jeden Versuch normiert wurden. Die Chlorophyllfluoreszenzbilder zeigten jedoch, dass die Oszillationsamplitude des Heterogenitätsmaßes bei der  $C_3$ -adaptierten Pflanze viel geringer war als bei der CAM- adaptierten Pflanze.

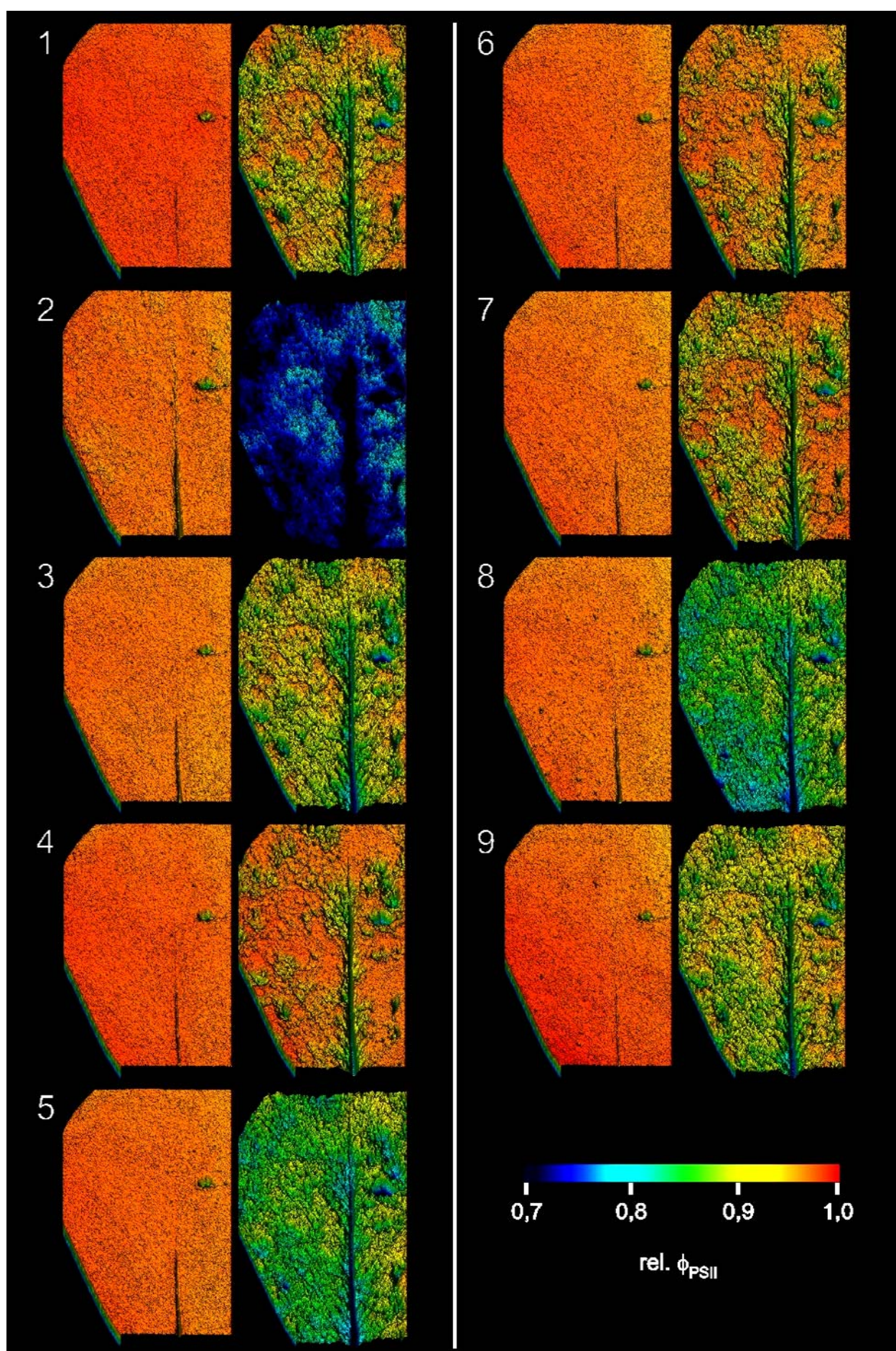
Die maximalen Werte des Heterogenitätsmaßes unter 1%  $O_2$  wurden im endogenen Rhythmus beim Anstieg von niedrigen zu hohen Werten von  $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$  und rel.  $\phi_{PSII}$  erreicht. Dies war bei den ersten beiden Peaks in der CAM- adaptierten Pflanze besonders ausgeprägt, bei der  $C_3$ - adaptierten Pflanze nur bei dem ersten Peak. Interessanterweise stimmte bei der CAM- adaptierten Pflanze die zeitliche Lage dieser maximalen Werte des Heterogenitätsmaßes mit der Phase der maximalen Werte der prozentualen photorespiratorischen Aktivität überein. Die minimalen Werte des Heterogenitätsmaßes wurden in beiden Pflanzen immer bei den maximalen Peaks von  $J_{CO_2}$  gefunden. Das Steigen des Heterogenitätsmaßes während der endogenen Rhythmik unterschied sich bei  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen. Es begann in beiden Pflanzen noch während der ersten Peaks von  $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$  und rel.  $\phi_{PSII}$ . Bei der  $C_3$ - adaptierten Pflanze erreichte es die höchsten Werte noch während der ersten Periode. Bei der CAM- adaptierten Pflanze geschah dies jedoch beim Anstieg von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  in der zweiten Periode.

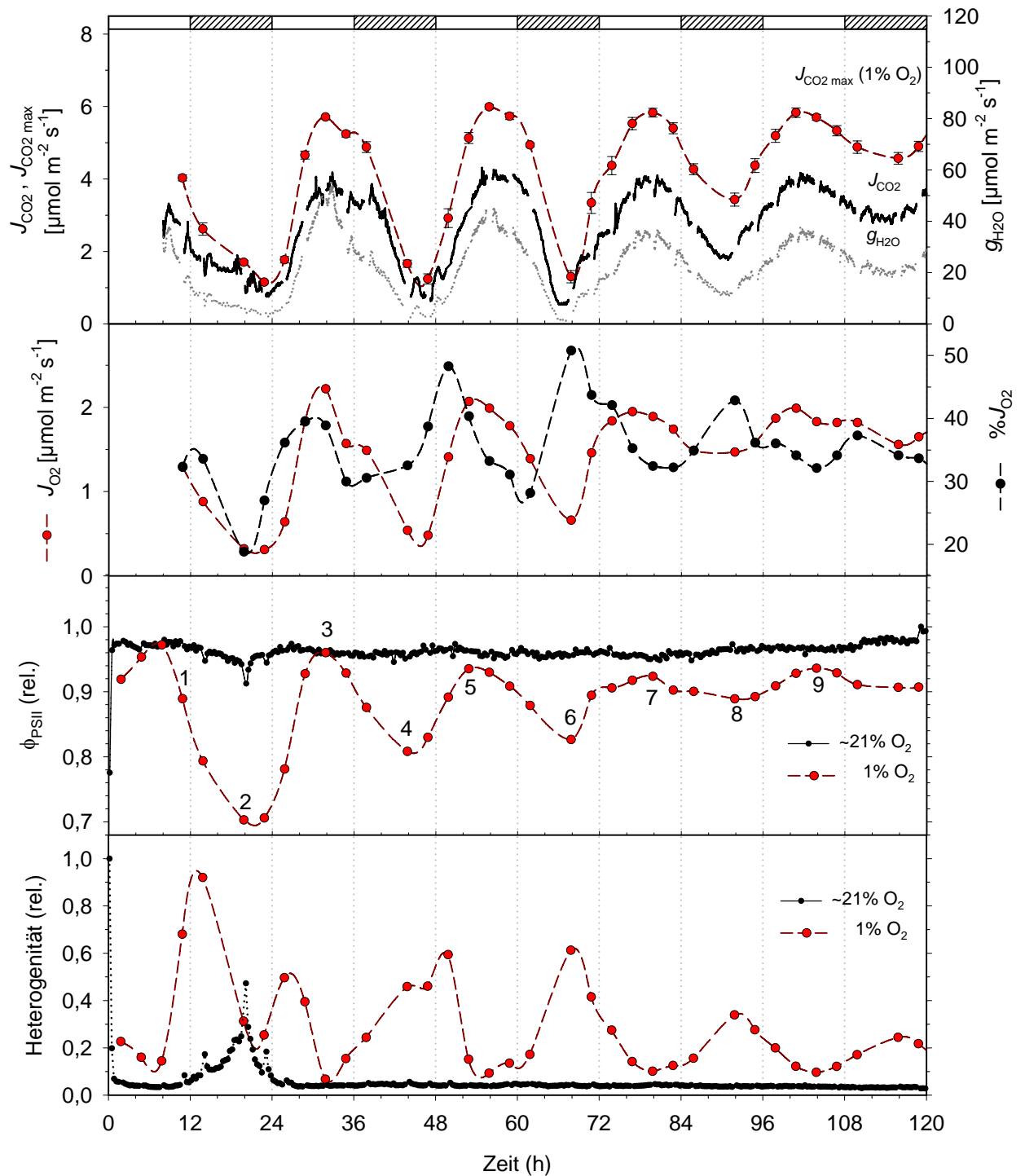


**Abb 3.16.** Endogener Rhythmus eines Blattes einer  $\text{C}_3$ -adaptierten *C. minor*-Pflanze mit Applikation von Luft mit 1% Sauerstoff. Temperatur:  $25^\circ\text{C}$ ; Lichtintensität  $120 \pm 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Oben: Netto- $\text{CO}_2$ -Austauschrate ( $J_{\text{CO}_2}$ ), Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ) und maximale Carboxylierungsrate ( $J_{\text{CO}_2 \text{ max}}$ ) gemessen durch die Applikation von Luft mit 1%  $\text{O}_2$ . Mitte Oben: Errechnete Photorespirationsrate ( $J_{\text{O}_2}$ ) und prozentuale Photorespirationsrate ( $\% J_{\text{O}_2}$ ). Mitte Unten: Relative Effizienz des Photosystem II ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) unter normaler Luft und unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$ . Unten: Heterogenitätsmaß errechnet aus Bildern der  $\phi_{\text{PSII}}$ , die unter normaler Luft und unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$  aufgenommen wurden. Hier bezeichnen die Nummern die Bilder der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  in Abbildung 3.17.

**Abb. 3.17.** (Nächste Seite) Bilder der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  während des endogenen Rhythmus in  $\text{C}_3$ -adaptierten *C. minor* Pflanze. Für jede eine Nummer in der Abb. 3.16 (Mitte Unten) werden zwei Bilder gezeigt: eines unter normaler Luft (Links) und andere unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$  (Rechts).



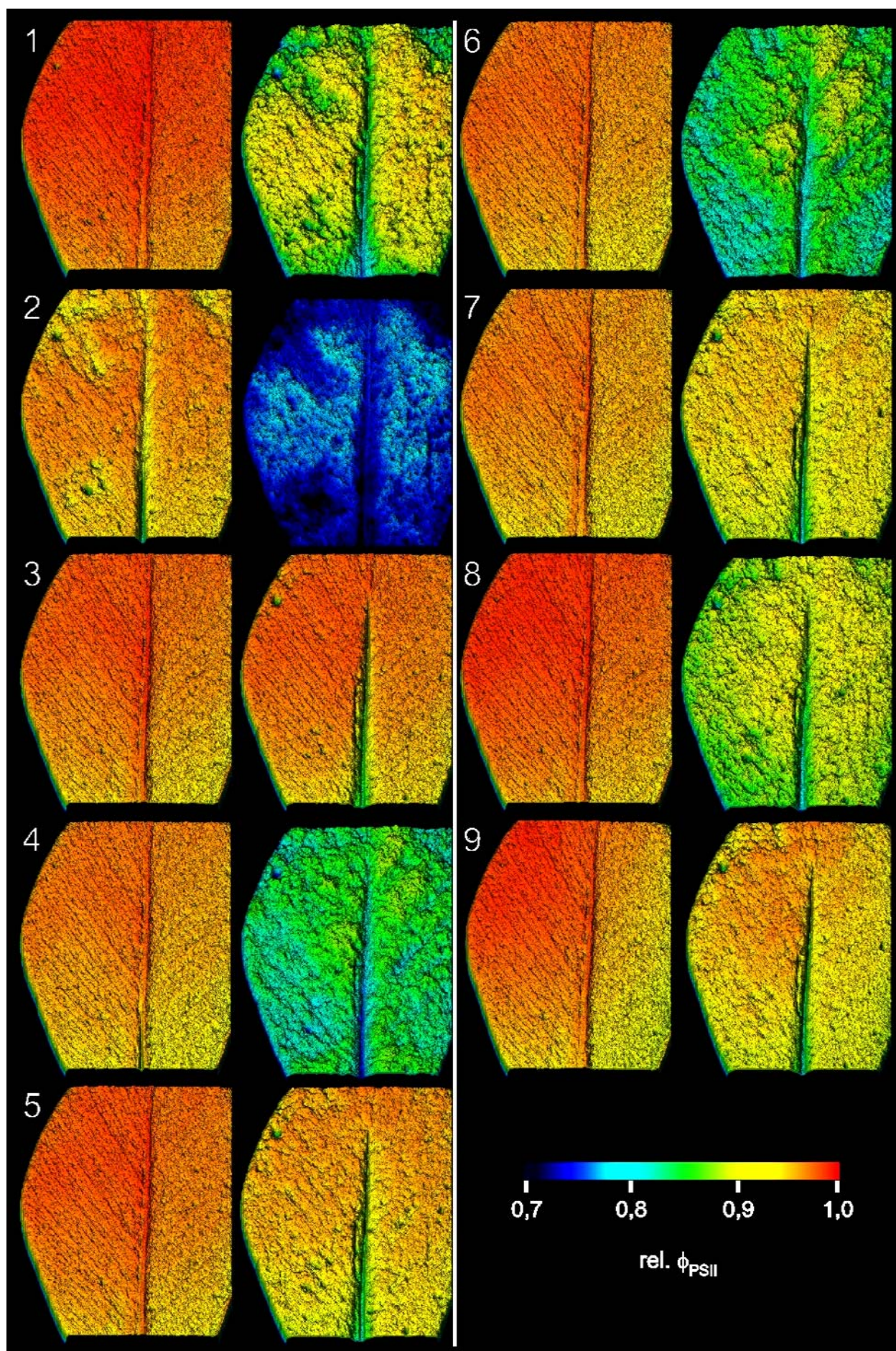




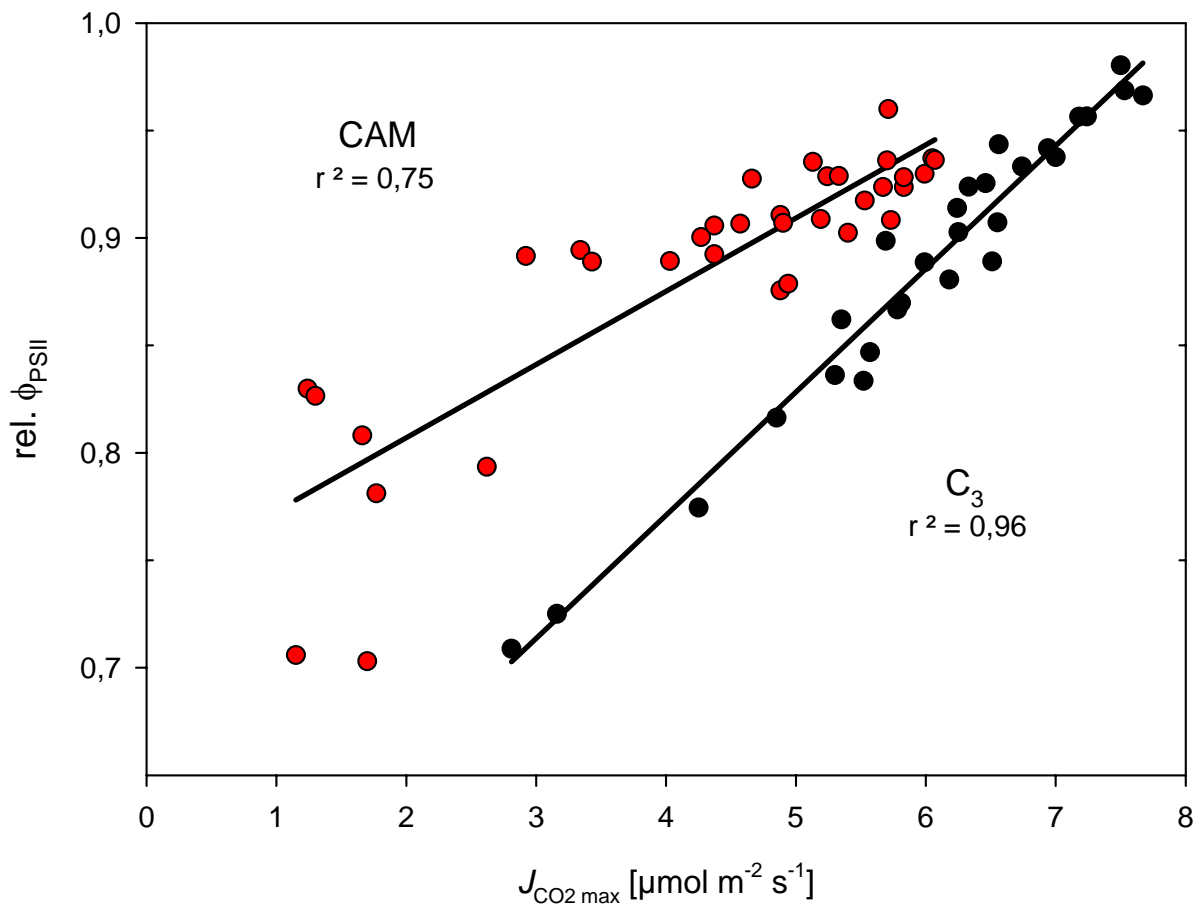
**Abb 3.18.** Endogener Rhythmus eines Blattes einer CAM- adaptierten *C. minor*-Pflanze mit Applikation von Luft mit 1% Sauerstoff. Temperatur: 25°C; Lichtintensität  $120 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Oben: Netto- $\text{CO}_2$ -Austauschrate ( $J_{\text{CO}_2}$ ), Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{\text{H}_2\text{O}}$ ) und maximale Carboxylierungsrate ( $J_{\text{CO}_2 \text{ max}}$ ) gemessen durch die Applikation von Luft mit 1%  $\text{O}_2$ . Mitte Oben: Errechnete Photorespirationsrate ( $J_{\text{O}_2}$ ) und prozentuale Photorespirationsrate ( $\%J_{\text{O}_2}$ ). Mitte Unten: Relative Effizienz des Photosystem II ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) unter normaler Luft und unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$ . Unten: Heterogenitätsmaß errechnet aus Bildern der  $\phi_{\text{PSII}}$ , die unter normaler Luft und unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$  aufgenommen wurden. Hier bezeichnen die Nummern die Bilder der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  in Abbildung 3.19.

**Abb. 3.19.** (Nächste Seite) Bilder der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  während des endogenen Rhythmus in CAM- adaptierten *C. minor*- Pflanze. Für jede Nummer in der Abb. 3.18 (Mitte Unten) werden zwei Bilder gezeigt: ein unter normaler Luft (Links) und andere unter Luft mit 1%  $\text{O}_2$  (Rechts).





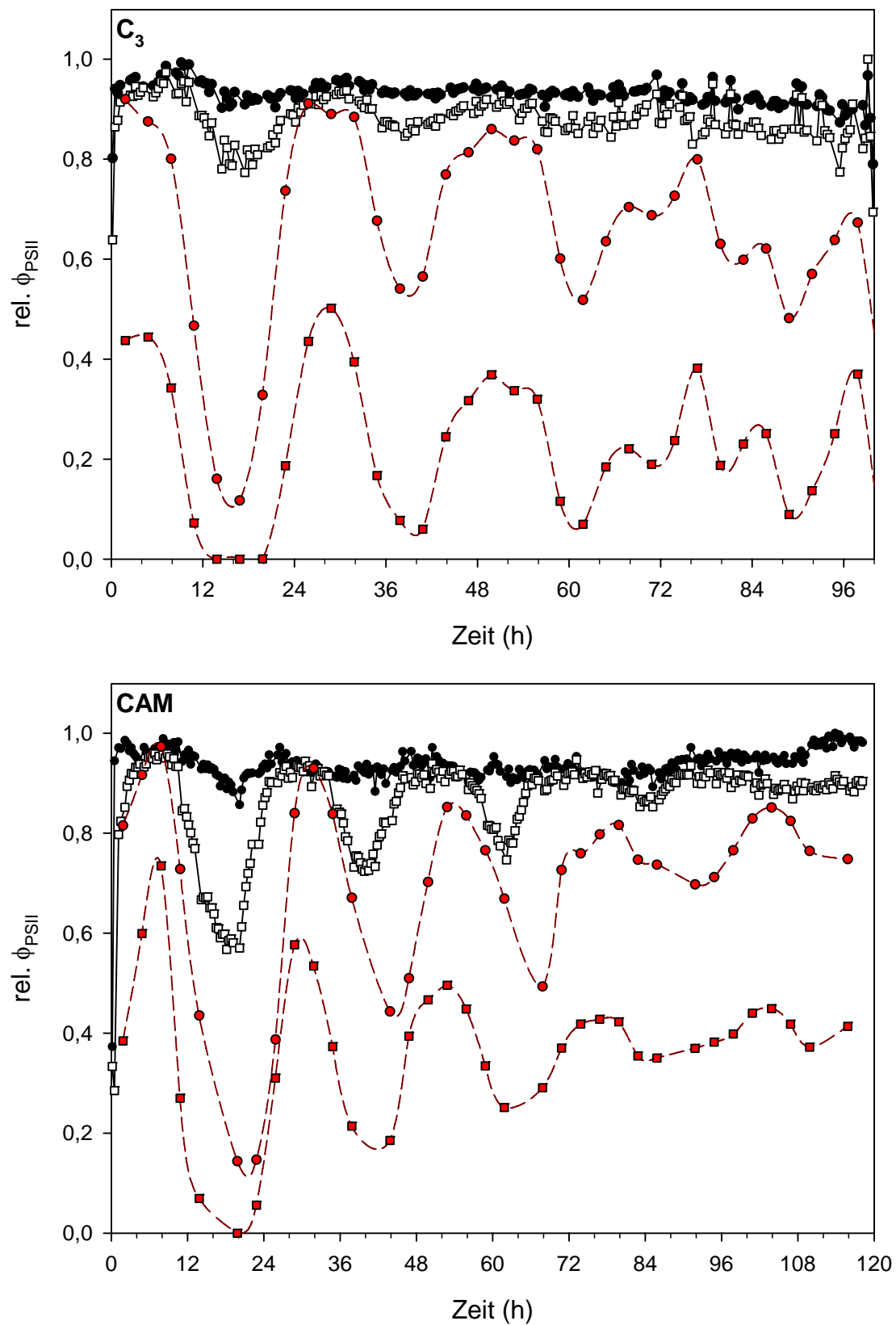




**Abb 3.20.** Korrelation zwischen der maximalen Netto- $\text{CO}_2$ -Aufnahme, und der relativen Effizienz des Photosystem II (rel.  $\phi_{\text{PSII}}$ ), in einer  $\text{C}_3$ - (schwarze Kreise) und einer CAM- adaptierter Pflanze (rote Kreise) im Dauerlicht. Die Werte kommen aus den Abbildungen 3.16 und 3.18 und wurden durch die Applikation des Gasgemisches mit 1%  $\text{O}_2$  ermittelt. Die angegebenen Pearson's Korrelationskoeffizienten für jede der linearen Kurvenanpassungen unterscheiden sich mit  $p < 0,001$ .

Die Abbildung 3.21 stellt das rhythmische Verhalten der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  auf dem Interkostalfeld und auf dem Hauptleitbündel, unter normaler Luft und mit Applikationen von Luft mit 1%  $\text{O}_2$ , bei  $\text{C}_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen gegenüber. Oszillatorisches circadianes Verhalten der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  im Dauerlicht wurde auf dem Leitbündel unter normaler Luft bei beiden photosynthetischen Modi beobachtet. Bei den CAM- adaptierten Pflanzen war die Amplitude der Schwankungen größer als bei den  $\text{C}_3$ - adaptierten Pflanzen. Unter den Applikationen von Luft mit 1%  $\text{O}_2$  zeigten die Oszillationen der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  auf dem Hauptleitbündel in beiden photosynthetischen Modi ähnliche Amplituden wie auf dem Interkostalfeld. Das generelle Niveau der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  war jedoch auf den Hauptleitbündeln niedriger als auf dem Interkostalfeld. Das zeigte zuerst, dass die Nutzung von Energie der Lichtreaktionen auf dem Hauptleitbündeln in photorespiratorischen Reaktionen größer ist als beim Interkostalfeld. Im Vergleich mit dem oszillatorischen Verhalten der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  unter normaler Luft zeigte dies jedoch eine Begrenzung des kompensatorischen Einflusses der photorespiratorischen Aktivität auf die Energienutzung der Lichtreaktionen im Hauptleitbündel.

Bei den  $C_3$ -adaptierten Pflanzen waren Oszillationen der rel.  $\phi_{PSII}$  unter Luft mit 1%  $O_2$  zwischen den beiden Messfeldern in kleinen Details synchronisiert. Bei den CAM- adaptierten Pflanzen gingen die Oszillationen der rel.  $\phi_{PSII}$  auf den Hauptleitbündeln bei den ersten zwei Peaks im Dauerlicht etwa 3 Stunden vor, d. h., sie waren in der Phase desynchronisiert. Bei dem Aussterben des Rhythmus wurde eine Tendenz zur Synchronisierung von beiden Blattteilen beobachtet. Das bedeutet, dass eine schwache Kopplung zwischen dem Hauptleitbündel und dem Interkostalfeld in CAM- adaptierten Pflanzen vorliegt.



**Abb. 3.21.** Vergleich des endogenen Rhythmus der relativen Effizienz des Photosystem II ( $\text{rel. } \phi_{\text{PSII}}$ ) auf dem Interkostalfeld und Hauptleitbündel in Blättern einer C<sub>3</sub>- und einer CAM- adaptierten *C. minor*-Pflanze. Schwarze Kreise, Interkostalfeld und normale Luft, weiße Quadrate, Hauptleitbündel und normale Luft; rote Kreise Interkostalfeld und Luft mit 1% O<sub>2</sub>; rote Quadrate, Hauptleitbündel und Luft mit 1% O<sub>2</sub>.

### 3.4 Blattanatomie von *C. minor*

Die Abbildung 3.22 zeigt einige Aspekte der Blattanatomie von *C. minor* Pflanzen, die unter den gleichen Bedingungen wie für die entsprechenden Gaswechselversuche angezogen wurden. Das Blatt ist hypostomatisch mit  $180 \pm 17$  Stomata pro  $\text{mm}^2$  ( $n=36$ ). Querschnitte der Schliesszellen sind in Abbildung 3.22 E und F zu sehen. Die adaxiale Epidermis hat eine deutliche kutikulare Schicht. Flanschen der Kutikula werden zwischen den Epidermiszellen beobachtet (Abb. 3.22 D). Unter der adaxialen Epidermis findet man drei bis vier dicht gepackte hypodermale Schichten. Das Assimilationsgewebe des Mesophylls ist in Palisadenparenchym und Schwammparenchym differenziert, typisch für Laubblätter. Das Palisadenparenchym zeigt drei bis fünf Schichten von Zellen mit sehr wenig interzellulären Lufträumen dazwischen (Abb. 3.22 A, C).

Die Zellen des Schwammparenchyms orientieren sich antiklin, und eine große Ausdehnung interzellulärer Lufträume ist bemerkbar. Durch Infiltrationstechnik wurde das Volumen der interzellulären Lufträume bestimmt. Es beträgt 9,3% des gesamten Blattvolumens. Die Abbildungen 3.22 A und E zeigen, dass sich ein großer Anteil dieses Volumens in dem Schwammparenchym befindet. Auf der oberen adaxialen Seite der Leitbündel befindet sich eine dünnere aber mit dem übrigen Palisadenparenchym kontinuierliche Schicht von Palisadenparenchym (1 bis 4 Schichten von Zellen) (Abb. 3.22 B). Das Schwammparenchym fehlt hier jedoch, und das Hauptleitbündel wird von isodiametrischen Parenchymzellen (Grundgewebe) eingepackt, die auch Kontakt mit dem Palisadenparenchym haben. Hier werden kaum interzelluläre Lufträume beobachtet.

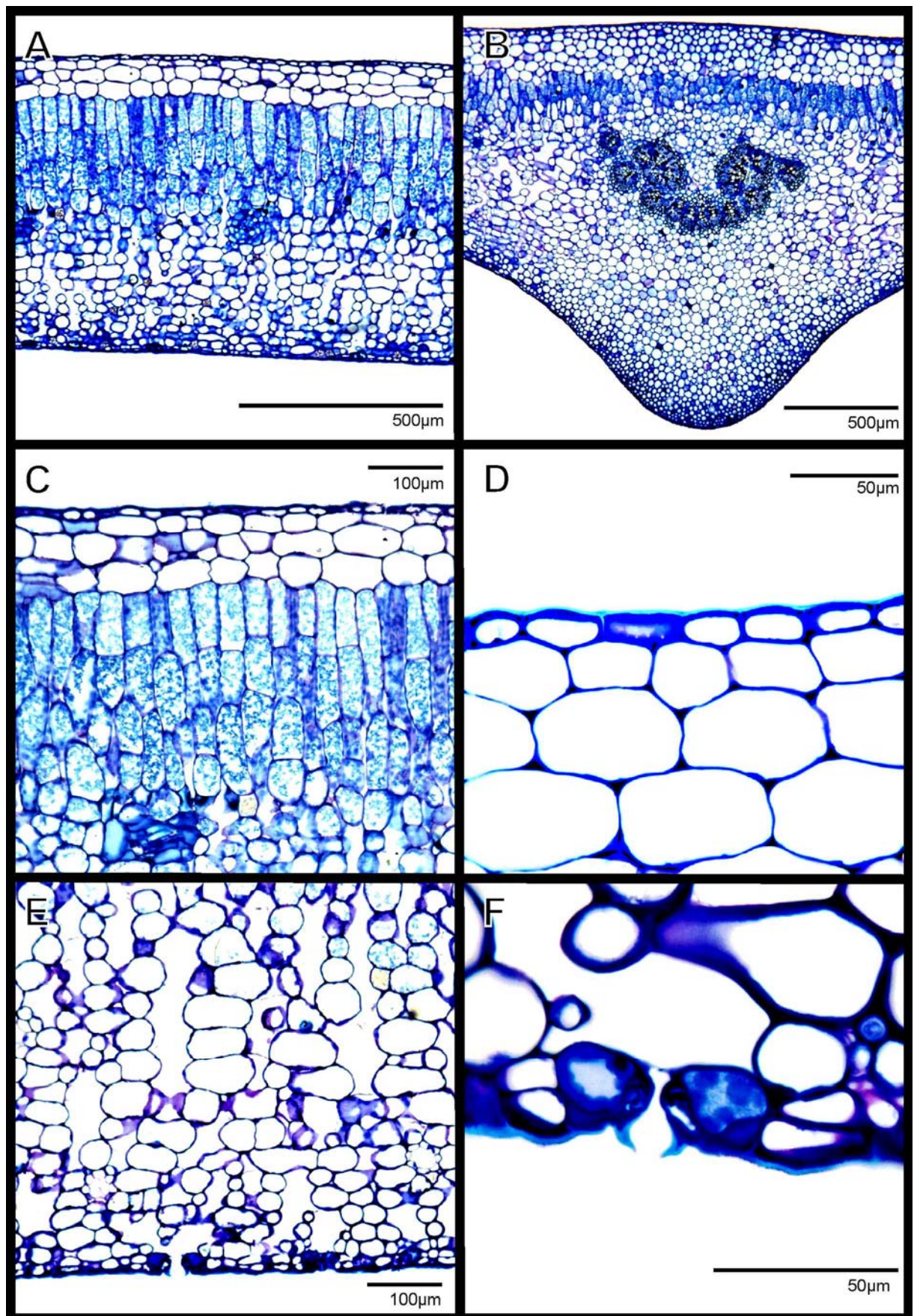


Abb. 3.22. Querschnitt des Blattes von *C. minor*. A) Interkostalfeld. B) Hauptleitbündel. C) Detail des Palisadenparenchyms Interkostalfeld. D) Detail der adaxial Epidermis und Hypodermis. E) Detail des Schwammparenchyms; F) Detail der abaxialen Epidermis und Stomata.



## 4 DISKUSSION

Das Hauptziel dieser Arbeit liegt im Vergleich des endogenen Rhythmus von Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz in einem System, wo die Expression des Crassulaceen Säurestoffwechsels (CAM) kontrolliert werden kann. Seit etwa 15 Jahren weiß man, dass *Clusia minor* eine C<sub>3</sub>/CAM intermediäre Pflanze ist, deren Umschaltung zwischen den Photosynthesemodi reversibel ist. Aus diesem Grund ist diese Art ein interessantes Modell für die Untersuchung des circadianen CAM-Rhythmus.

### 4.1 Teil 1. Adaptation und Analyse von Tagesgängen

*Die Adaptation für C<sub>3</sub>- und CAM- Zustände: kurzer Trockenstress aktiviert den CAM Stoffwechsel*

Der erste Schritt dieser Arbeit besteht in der Adaptation der *C. minor* Pflanzen zur C<sub>3</sub>- oder CAM-Photosynthese für spätere Versuche im Dauerlicht. Diese Art ist schon bekannt im Hinblick auf ihre schnelle Umstellung vom C<sub>3</sub>- zum CAM- Zustand durch Änderungen der Wasserverfügbarkeit, der Bestrahlungsstärke, des Tag/Nacht-Temperaturwechsels und des Wasserdampfdruck-Gefälles zwischen dem Blattgewebe und der Luft (Schmidt *et al.*, 1988; Franco *et al.*, 1990, 1991, 1992; Borland *et al.*, 1992; Haag-Kerwer *et al.*, 1992; de Mattos, 1999; de Mattos und Lüttge, 2001). Die benutzte Lichtintensität für Dauerlicht Experimente war relativ niedrig (ca. 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). In diesem Bereich erreichen *C. minor* Pflanzen den C<sub>3</sub>-Zustand, wenn sie konstante Tag/Nacht-Temperatur und keinen Wassermangel haben. Um den CAM-Zustand zu induzieren, wurde als Methode ein kurzzeitiger Trockenstress (3 bis 4 Tage) anstelle von Tag/Nacht Änderungen der Temperatur gewählt. Der Vorteil liegt darin, dass Trockenstress einen systemischen Effekt auf die gesamte Versuchspflanze produziert. Bei den Tag/Nacht Temperaturregimen entstanden immer Unterschiede zwischen Pflanze und Versuchsblatt, weil die Temperaturkontrolle in der Versuchsküvette viel genauer (0,1°C) als in der Phytotronkammer (2 bis 3°C) war. Konstante Temperaturen während der Versuche vermeiden mögliche „Interferenzen“ von Blättern neben dem Versuchsblatt und dem Versuchsblatt selbst. Außerdem ermöglichen konstante Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen präzisere Gaswechsellmessungen, besonders beim Wechsel von Tag/Nacht-Bedingungen. Die Ergebnisse deuten

darauf hin, dass Trockenstress effektiv war, um in *C. minor* C<sub>3</sub>- und CAM- Gaswechsellmuster unter konstanten Tag/Nacht-Temperaturen zu erreichen (Abb. 3.1 und 3.2).

Es gibt in der Literatur zahlreiche Beispiele der Wirkung von Trockenstress auf die Expression des CAM. Eine Induktion des CAM durch Trockenstress wurde auch schon für andere C<sub>3</sub>/CAM intermediäre Arten in unterschiedlichen Familien berichtet, wie in *Pedilanthus tithymaloides*, Euphorbiaceae, (Reddy & Gnanam, 2003), *Mesembryanthemum crystallinum*, Aizoaceae, (Cushman *et al.*, 1990; Herppich *et al.*, 1992) und in C<sub>3</sub>-CAM intermediären *Sedum*-Arten, Crassulaceae (Groenhof *et al.* 1988, 1990; Conti & Smirnov 1994). Die bekannte Wirkung des Trockenstress bei der Induktion von CAM ermöglicht sogar die Untersuchung des Vorkommens von CAM und seiner evolutionären Bedeutung innerhalb von Gattungen, die früher als typische C<sub>3</sub>- Pflanzen betrachtet wurden (z.B., bei der Gattung *Pelargonium*, Jones *et al.* 2003). In obligaten CAM-Pflanzen spielt der Trockenstress eine wichtige Rolle bei der Plastizität des CAM. Kurzer Trockenstress erhöht die CO<sub>2</sub>-Aufnahme im Dunkeln bei *K. daigremontiana* und bei *C. minor*, aber lang andauernder Trockenstress hat die gegenteilige Wirkung, und viele Arten können sogar zum CAM-*idling* umgeschaltet werden (Cushman, 2001). In der obligaten CAM-Pflanze *Xerosicyos danguyi* (Cucurbitaceae) induzierte Trockenstress den „CAM-*idling*“ Modus zusammen mit der Erhöhung der PEPC-mRNA Expression und der PEPC- Aktivität (Bastide *et al.*, 1993). Ein exotischer Fall liegt aber bei der Art *Portulaca grandiflora* vor, einer C<sub>4</sub>/CAM-cycling<sup>1</sup> Pflanze (C<sub>4</sub>-Photosynthese in Blättern und CAM-cycling im Stamm), wobei der Trockenstress zum CAM -*idling*<sup>2</sup> -Zustand im Stamm führt (Guralnik, 2002).

Der Mechanismus der CAM Induktion durch Trockenstress ist mit Signalen aus den Wurzeln (Eastmond & Ross, 1997), der Produktion von ABA (Taybi & Cushman, 1999) und mit Änderungen im Zellturgor (Winter & Gademann, 1991) verbunden. Bei *M. crystallinum* (nicht reversibler C<sub>3</sub>-CAM-Wechsel) induziert ABA-Applikation (Chu *et al.*, 1990; Edward *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 1994; Taybi *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1996) oder osmotischer Stress (Taybi & Cushman, 1999) den CAM- Zustand zusammen mit der Transkription von CAM-relevanten Genen, wie einer spezifischen Isoform der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*Ppc1*) (Taybi & Cushman, 1999). In derselben Arbeit schließen die Autoren, dass die Genexpression während der Induktion des CAM durch externes Ca<sup>++</sup> signalisiert und

<sup>1</sup> Beim Photosynthesemodus des CAM-cycling werden kleine Tag-/Nacht-Schwankungen des organischen Malatgehaltes beobachtet, und das in der Atmung produzierte CO<sub>2</sub> wird wieder fixiert. Das Gaswechsellmuster ist dem einer C<sub>3</sub>-Pflanze sehr ähnlich, aber die Stomata schließen während der Dunkelphase (Cushman, 2001).

<sup>2</sup> Beim CAM-*idling* schließt die Pflanze aufgrund von Trockenstress die Stomata während Tag und Nacht komplett, und keine Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme wird beobachtet. Das CO<sub>2</sub> der Atmung wird im Dunkeln durch die PEPC-Aktivität als Malat fixiert und während des Tages freigesetzt und wieder im C<sub>3</sub>-Zyklus fixiert (Cushman, 2001).

vermittelt wird. ABA, osmotischer Stress und ionischer Stress sind wahrscheinlich die Faktoren, die auf  $\text{Ca}^{++}$  Signale einwirken.

In Pflanzen von *C. minor*, die durch hohe Lichtintensität zum CAM-Zustand adaptiert wurden, erhöht sich auch der ABA-Gehalt mit der progressiven Reduktion des Wasserpotentials im Boden innerhalb von 10 Tagen Trockenstress (Herzog *et al.*, 1999). Bei der obligaten  $\text{C}_3$ -Pflanze *C. multiflora* haben die Autoren dies nicht beobachtet. Taybi *et al.* (2004) zeigten für *C. minor* Pflanzen, die vorher durch Licht und Tag/Nacht Temperaturwechsel zum CAM-Zustand adaptiert wurden, dass sich in fünf Tagen unter Trockenstress die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme in der Dunkelphase erhöhte und die tägliche Variation des Malatgehalts und die Transkriptionsabundanz des *Ppck* Gens (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Kinase) erhöht wurden. Entsprechende Effekte auf *Ppck* Transkripte in der obligaten  $\text{C}_3$ -Pflanzen *C. multiflora* und *C. aripoensis* wurden nicht beobachtet.

### Tag/Nacht-Rhythmus

Zwischen verschiedenen Versuchen wurden die Temperaturen variiert (20°C, 25°C und 30°C), und der Verlauf des Tag/Nacht-Rhythmus wurde in Abhängigkeit von den Temperaturen untersucht. Die ausgewählten Temperaturen produzierten deutliche Unterschiede im der photosynthetischen Verhalten der  $\text{C}_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor*. In der Dunkelphase zeigten die  $\text{C}_3$ - adaptierten Pflanzen kaum Unterschiede zwischen den Temperaturbehandlungen (Fig. 3.1.). Aber die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme und die stomatäre Leitfähigkeit waren im Dunklen bei  $\text{C}_3$ - adaptierten Pflanzen interessanterweise immer nahe Null. In Anbetracht des CAM-cycling-Konzeptes (nach Cushman, 2001) lässt dieses Ergebnis die Vermutung zu, dass Blätter von *C. minor*, die unter einer Lichtintensität von  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  adaptiert wurden, das Atmungs-  $\text{CO}_2$  wieder zur Produktion von organischer Säure verwenden. Andererseits wurden keine detektierbaren Schwankungen von Malat und Citrat in Pflanzen gefunden, die unter ähnlichen Bedingungen wie für die Gaswechsellmessungen gehalten wurden (Tab. 1). Bei den CAM- adaptierten Pflanzen war die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme im Dunkeln zur Temperatur entgegengesetzt korreliert (Fig. 3.2). Diese Ergebnisse bekräftigen zwei Prozesse, die beim CAM die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme im Dunkeln beeinflussen: Zuerst ist hohe Temperatur günstig für die allosterische Hemmung der PEPC, weil die Stabilität ihrer phosphorylierten Form (unempfindlicher gegenüber der Hemmung durch Malat) umgekehrt zur Temperatur korreliert ist (Buchanan-Bollig & Kluge, 1981; Carter *et al.*, 1995). Zweitens beeinflusst die Temperatur die Fluidität von Lipidmembranen und besonders die Fähigkeit des Tonoplasten zur Malat-Kompartimentierung in der Vakuole. Je höher die Temperatur ist, desto stärker ist die Permeabilität des Tonoplasten für Malat (Friedert *et al.* 1988;

Kliemchen *et al.* 1993; Lüttge, 2000). Auf diese Weise begünstigen höhere Temperaturen den „futile cycle“ (Malatproduktion und Remobilisierung) und auch die Hemmung der PEPC.

Intermediäre Temperaturen erscheinen optimal für die  $C_3$ -Photosynthese bei *C. minor*. Die Lichtphase bei  $C_3$ - adaptierten Pflanzen zeigt ein deutliches Photosyntheseoptimum bei 25°C (Abb. 3.1). Bei derselben Temperatur zeigten die CAM- adaptierten Pflanzen die höchste Amplitude der  $CO_2$ - Aufnahme während der Lichtphase (Abb. 3.2). Das weist darauf hin, dass 25°C die optimale Temperatur für die  $C_3$ -Carboxylierung war. Verschiedene *in vitro* Versuche zeigten, dass die RUBISCO- Aktivität bei 35°C am besten ist. Die Netto- $CO_2$  Aufnahme ist jedoch eine Messung *in vivo* und unterliegt einem Zusammenhang verschiedener anderer Faktoren. Bei 25°C zeigten dann die Tagesgangmessungen bei *C. minor* die beste Ausprägung der vier Phasen des CAM (nach Osmond, 1978).

*$C_3$ - und CAM- adaptierte Pflanzen von *C. minor* unterscheiden sich in der zeitlich-räumlichen Dynamik der relativen Quanten-Effizienz des Photosystem II (rel.  $\phi_{PSII}$ )*

$C_3$  und CAM- adaptierte Pflanzen von *C. minor* unterscheiden sich in ihrem Verhalten bei der Nutzung des Lichtes in der Photosynthese. Die zeitlichen Änderungen des errechneten Heterogenitätsmaßes von  $\phi_{PSII}$ - Bildern bedeuten, dass die Energienutzung bei der Photosynthese in bestimmten Momenten sich in unterschiedlichen Teilen der Interkostalfelder eines Blattes nicht gleich entwickelt. Bei  $C_3$ - adaptierten Pflanzen erfolgte dies nur am Anfang der Lichtphase, als die stomatäre Leitfähigkeit sehr niedrig war. Lokale Widerstände für die Diffusion von  $CO_2$  und unterschiedliche Konzentrationen von  $CO_2$  im Blattgewebe ( $p_{CO_2}^i$ ) können zur Heterogenität der Stomata-Bewegung in  $C_3$ -Pflanzen führen und, auf diese Weise, die photosynthetischen Prozesse beeinflussen (Beyschlag und Eckstein, 1997). Stomatabewegung und  $p_{CO_2}^i$  sind durch *feedback loops* eng gekoppelt, und in der Regel führt die Erniedrigung von  $p_{CO_2}^i$  zum Öffnen der Stomata, und *vice versa* (Schröder *et al.*, 2001). Die Heterogenität bei  $C_3$ -adaptierten Pflanzen von *C. minor* erreichte minimale Werte, sobald sich die stomatäre Leitfähigkeit erhöhte. In der Abb. 3.3 wird auch die Abhängigkeit von  $p_{CO_2}^i$  von der stomatären Leitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) bei der  $C_3$ -Photosynthese in *C. minor* bewiesen.

Schwankungen von  $\phi_{PSII}$  und des Heterogenitätsmaßes waren eigentlich eine Eigenschaft von *C. minor* im CAM- Zustand, die besonderes bei den Phasen II und IV stark ausgeprägt war. Hier kann die Heterogenität von  $\phi_{PSII}$  nicht nur durch die stomatäre Bewegung erklärt werden, weil  $p_{CO_2}^i$  und  $g_{H_2O}$  nicht miteinander linear korreliert sind (Abb. 3.3). Borland & Griffiths (1996) zeigten dass die

Aktivitäten von PEPC und RUBISCO in *C. minor* im CAM-Zustand sich in Phase II und IV überlappen. In diesen Phasen kann der Verbrauch von  $\text{HCO}_3^-$  bei der PEPC-Aktivität  $p_{\text{CO}_2}^i$  und die  $\text{CO}_2$  Versorgung der RUBISCO im Calvinzyklus beeinflussen. Die durch die Aktivität des PSII angezeigte Energienutzung beim Calvinzyklus wird dann kleiner. Die Heterogenität von  $\phi_{\text{PSII}}$  in der Phase II wies darauf hin, dass das Zusammenspiel von beiden Enzymen auf der Blattspreite nicht gleichmäßig geschieht. Dies wies auf einen Verlust von Phaseinformation zwischen verschiedenen Blatteilen hin.

Die Heterogenität von  $\phi_{\text{PSII}}$  wird beim Übergang von Phase II zu Phase III sehr gering. Die Erhöhung von  $p_{\text{CO}_2}^i$  durch Malatdecarboxylierung zusammen mit dem Schließen der Stomata ermöglicht in *K. daigremontiana* eine laterale Diffusion von  $\text{CO}_2$ , da eine dichte Packung der Blattzellen einen interzellulären Luftraum von etwa 3% produziert (Duarte *et al.* 2005). Es ist möglich, dass das gleiche Phänomen auch bei *C. minor* Blättern vorliegt, weil bei dieser Art der interzelluläre Luftraum etwa drei mal so groß ist wie bei *K. daigremontiana* und der Widerstand für die laterale Diffusion dann sogar geringer ist. Dasselbe Phänomen wurde während des Übergangs von Phase II zu Phase III auch in Blatteilen von *C. minor* beobachtet, die zum Verschließen der Stomata auf der unteren Seite mit „Tesa-Band“ bedeckt wurden (Daten nicht gezeigt).

Zeitlich-räumliche Phänomene der  $\phi_{\text{PSII}}$  wurden von Rascher & Lüttge (2002) bei Tagesgangmessungen an *K. daigremontiana* beobachtet. Diese Autoren beschrieben eine maximale Heterogenität beim Übergang von Phase III zu Phase IV, als sich eine Wellenfront von  $\phi_{\text{PSII}}$  auf der Blattspreite ausbreitete. Sie nahmen an, dass Differenzen von  $p_{\text{CO}_2}^i$  am Ende der Phase III, die möglicherweise durch lokale Unterschiede im Malatgehalt verursacht wurden, für die Produktion von Wellen der rel.  $\phi_{\text{PSII}}$  verantwortlich sind. Dies wurde dann von Duarte *et al.* (2005) für den endogenen Rhythmus von *K. daigremontiana* bewiesen. Da *C. minor* und *K. daigremontiana* eine stark unterschiedliche Blattanatomie haben, kann bei *C. minor* das zeitlich-räumliche Phänomen der  $\phi_{\text{PSII}}$  nicht allein durch den Diffusionswiderstand für  $\text{CO}_2$  erklärt werden. Möglicherweise erfolgt das Zusammenspiel von Reaktionen, die am  $\text{C}_3$ - und CAM-Zyklus beteiligt sind, auf der Blattspreite nicht gleichmäßig. Besonders beim  $\text{C}_3$ -CAM intermediären Verhalten ist es denkbar, dass auf der Blattspreite der CAM potentiell unterschiedlich ausgebildet ist. Auf jeden Fall bestätigt die vorliegende Arbeit, dass die dynamische Änderung der räumlichen Struktur der  $\phi_{\text{PSII}}$  eine Eigenschaft ist, die mit der Expression des CAM verbunden ist.

Das Verhalten der  $\phi_{PSII}$  auf dem Hauptleitbündel in  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor* weist darauf hin, dass dieser Blattteil nach der Adaptation zur  $C_3$ -Photosynthese noch ein CAM-Potential behält, weil die diurnale Variation der Photosyntheseparameter charakteristisch für die CAM-Photosynthese ist (Mattos & Lüttge, 2001). Die niedrigen Aktivitäten des Photosystem II am Anfang und am Ende der Lichtphase weisen auf die mögliche Ausprägung von Phase II und Phase IV hin, wo sich die Aktivität von RUBISCO und PEPC überlappen können. Außerdem war  $\phi_{PSII}$  in der Mitte Lichtphase auf dem Hauptleitbündel höher als auf dem Interkostalfeld (Abb. 3.4 und 3.5). Weiterhin befinden sich in diesem Blattteil die Parenchymzellen direkt auf dem Leitgewebe, und das Schwammparenchym fehlt. Der interzelluläre Luftraum ist an diesen Stellen wesentlich kleiner als im Interkostalfeld (Abb. 3.22). Das kann den lokalen Diffusionswiderstand für Gase erhöhen, und auf diese Weise kann dieser Blattteil sich ähnlich wie das photosynthetische Gewebe von sukkulenten CAM Pflanzen verhalten, wie z. B. bei *K. daigremontiana*. Am Anfang und Ende der Lichtphase, wenn die Photosynthese vom atmosphärischen  $CO_2$  abhängt, kann  $p_{CO_2}^i$  niedriger als im Interkostalfeld sein, und die Energienutzung der photosynthetischen Reaktionen wird geringer. Während der Mitte der Lichtphase wird Malat decarboxyliert, und das lokale  $p_{CO_2}^i$  kann auf Grund des erhöhten Diffusionswiderstandes grösser als im Interkostalfeld sein. Die Folge ist eine hohe photosynthetische Aktivität. Außerdem weist der Kurvenverlauf von  $\phi_{PSII}$  in  $C_3$  und CAM- adaptierten Pflanzen auf die Verstärkung der möglichen lokalen CAM-Aktivität hin, weil der CAM- Zustand durch die Applikation von Trockenstress erzeugt wurde. Das stimmt mit der Arbeit von Nelson *et al.* 2005 überein. Die Autoren haben die Blattanatomie von verschiedenen CAM Pflanzen von unterschiedlicher Herkunft untersucht. Außer den größeren Zellen und dickeren Blättern im Vergleich zu  $C_3$ - und  $C_4$ -Pflanzen haben CAM Pflanzen zusätzlich auch geringere interzelluläre Lufträume, die weniger Kontakt mit Mesophyllzellen haben. Das bedeutet eine Barriere für die Diffusion von atmosphärischem  $CO_2$  in den Phasen II und IV. Aber das behindert auch den Verlust von internem  $CO_2$ . *Clusia minor* hat jedoch eine für  $C_3$ - Pflanzen typische Blattanatomie mit ausdifferenziertem Palisaden- und Schwammparenchym (Abb. 3.22). In der Familie Clusiaceae gibt es aber auch die Tendenz zu einer steigenden Verdichtung des Mesophylls zusammen mit der Entwicklung des Potentials für CAM (Borland & Griffiths 1996; Nelson *et al.* 2005), die diese Art der Blattanatomie mit dem CAM verbindet. In *C. minor* kann die stärkere Expression des CAM in den Hauptleitbündeln ein Hinweis auf eine parallele Evolution von CAM und Blattanatomie sein.

*Die Carboxylaseaktivität der RUBISCO ist bei CAM- adaptierten Pflanzen, aber nicht bei C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen, variabel.*

Die Messung des Gaswechsels und die Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenz-Bildern unter nicht photorespiratorischen Bedingungen ermöglichten es, die Carboxylaseaktivität der RUBISCO und ihre räumliche Verteilung zu betrachten. Das photosynthetische Verhalten der C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor* unterschied sich in den Tagesgängen unter nicht photorespiratorischen Bedingungen wesentlich. Dies ist ein klarer Beweis dafür, dass die CAM-Aktivität (PEPC-Aktivität und Malat-Mobilisierung) die Carboxylaseaktivität der RUBISCO beeinflusst. Die prozentuale photorespiratorische Aktivität hatte sich bei den C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen nicht sehr geändert (32,1% bis 35,7%), was auf relativ konstante Bedingungen für die Carboxylaseaktivität der RUBISCO hindeutet. In CAM-adaptierten Pflanzen konnte sie nur in Phase II und am Anfang und Ende der Phase IV gemessen werden, weil während der Phase III die Stomata geschlossen waren, und die Applikationen von 1% O<sub>2</sub> zeigten keine Wirkung. Jedoch schwankte die prozentuale photorespiratorische Aktivität in den Phasen II und IV wesentlich mehr als bei Pflanzen im C<sub>3</sub>-Modus (15,6% bis 37,9%).

Die prozentuale photorespiratorische Aktivität betrug in der Phase II (15,6%) etwa die Hälfte wie am Anfang der Lichtphase bei C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen (33,7%). Dies weist darauf hin, dass die Decarboxylierung von organische Säure das CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> Verhältnis für die Carboxylaseaktivität der RUBISCO begünstigen kann. Der CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus des CAM konzentriert auch O<sub>2</sub> (Lüttge, 2002), aber bei *C. minor* kann dies allein die Oxigenaseaktivität der RUBISCO- nicht erhöhen. Am Anfang der Phase IV war die prozentuale photorespiratorische Aktivität höher als alle anderen gemessenen Werte, sogar für die C<sub>3</sub>-adaptierte Pflanze. Die Erschöpfung des Malatpools, die steigende, aber niedrige stomatäre Leitfähigkeit und die mögliche O<sub>2</sub>- Akkumulation im Blatt während der Phase III können zusammen zu einem niedrigeren CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>Verhältnis führen und die Carboxylaseaktivität der RUBISCO beeinträchtigen.

Die für das Interkostalfeld errechneten Werte der rel.  $\phi_{PSII}$  sanken während der Applikationen von Luft mit 1% O<sub>2</sub> stark ab. Dies geschah bei C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen (außer während der Phase III) (Abb. 3.8 und 3.10). Dies zeigt, dass die Photorespiration ein starker Dissipationsmechanismus für die Energie des absorbierten Lichts ist und bestätigt frühere Beobachtungen unter verschiedenen Bedingungen (Heber 2002; Heber et al. 2001; Osmond & Grace, 1995). Aber trotz der relativ

konstanten prozentualen photorespiratorischen Aktivität innerhalb der Tagesgänge bei  $C_3$ -adaptierten Pflanzen ergaben sich Unterschiede bei den Werten der rel.  $\phi_{PSII}$  unter nicht photorespiratorischen Bedingungen. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Erstens könnte ein zusätzlicher Mechanismus für die Dissipation von absorbierter Lichtenergie existieren, der für einen kleinen Anteil davon verantwortlich ist, wie zum Beispiel die Mehler-Reaktion (Assada, 1999). Andererseits könnte die Carboxylaseaktivität der RUBISCO durch interne Quellen von  $CO_2$  zu bestimmten Momenten im Tagesgang begünstigt werden. Für die erste Möglichkeit geben die Versuche der vorliegenden Arbeit keine Evidenz. Für die zweite Möglichkeit muss man sich wieder auf das Verhalten der Hauptleitbündel konzentrieren. Wenn das Hauptleitbündel CAM-Aktivität hat, wird in der Mitte der Lichtphase durch die Malat-Decarboxylierung  $CO_2$  freigegeben. Wegen der kleinen Menge von photosynthetischen Geweben im Hauptleitbündel (Abb. 3.22) ist dieser Unterschied bei den Messungen unter normaler Luft nicht detektierbar, weil die photorespiratorische Aktivität zur Stabilisierung der rel.  $\phi_{PSII}$  beiträgt. Aber unter nicht photorespiratorischen Bedingungen entspricht die Variation der rel.  $\phi_{PSII}$  in  $C_3$ -adaptierten Pflanzen dem Kurvenverlauf desselben Parameters in einer CAM- adaptierten Pflanze, wo die niedrigsten Werte am Anfang und Ende der Lichtphase liegen und höhere Werte in der Mitte der Lichtphase gefunden werden.

Die Erscheinung eines konstanten hohen Heterogenitätsmusters während der Applikationen von Luft mit 1%  $O_2$  im Tagesgang in  $C_3$ -adaptierten Pflanzen zeigte, dass die Carboxylaseaktivität der RUBISCO zwischen verschiedenen Blattteilen nicht gleich war. Dieses Ergebnis weist auf die Möglichkeit hin, dass die Blätter von *C. minor* anatomisch heterobar sind und die Carboxylaseaktivität der RUBISCO von lokalen Differenzen der  $CO_2$  Verfügbarkeit beeinflusst wird. Dies zeigt auch, dass diese Bedingungen sich mit der Zeit nicht änderten. Bei CAM adaptierten Pflanzen schwankte das Heterogenitätsmaß unter den verschiedenen Applikationen von Luft mit 1%  $O_2$  deutlich. Das bestätigt, dass das dynamische zeitlich-räumliche Muster der rel.  $\phi_{PSII}$  von Prozessen abhängt, die nur im CAM-Zustand ablaufen und direkt auf die Carboxylaseaktivität der RUBISCO wirken. Hier müssen die Aktivität der PEPC und die Decarboxylierung von Malat hervorgehoben werden, weil beide Prozesse  $p_{CO_2}^i$  beeinflussen. Dieses Ergebnis deutet auf ein Zusammenspiel hin, von PEPC / RUBISCO während der Phase II und am Ende der Phase IV und von Malat-Decarboxylierung / RUBISCO während der Phase III und beim Übergang zur Phase IV.



## 4.2 Teil 2: Analyse des endogenen Rhythmus im Dauerlicht

Oszillatorisches Verhalten der CO<sub>2</sub>-Aufnahme und der stomatären Leitfähigkeit im Dauerlicht wurde bei C<sub>3</sub> und CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor* deutlich beobachtet (Abb.3.12 und 3.13). Die Analyse der Perioden zeigte nicht nur, dass diese Oszillationen circadianes Verhalten haben, sondern auch, dass sie temperaturkompensiert sind (Tabelle 2). Anhaltende circadiane Oszillationen der CO<sub>2</sub>-Aufnahme wurden bei der obligaten CAM Pflanze *Kalanchoë daigremotiana* in bestimmten Bereichen der Lichtintensität und Temperatur erreicht (Buchanan-Bollig, 1984). Kleine Änderungen in diesem Parameter können zu Übergängen von rhythmischem zu arrhythmischem Verhalten führen (Lüttge & Beck, 1992). Hohe Temperaturen führen bei dieser Art zur einem arrhythmischen Zustand bei leerer Vakuole, während bei niedrigen Temperaturen der arrhythmische Zustand bei Malat-gefüllter Vakuole erreicht wird (Grams, *et al.* 1996). Bei *C. minor* wurde bei 21°C eine deutliche Tendenz zum arrhythmischen Verhalten beobachtet. Bei 30°C war das oszillatorische Verhalten aber deutlich. Die Fluidität des Tonoplasten ändert sich mit der Temperatur. Bei Adaptation der Pflanze an höhere Temperatur kann sich auch die Tonoplasten-Fluidität ändern (Kluge *et al.* 1991; Kliemchen *et al.* 1993). Die Pflanzen von *C. minor* wurden in einer Kammer mit Temperaturen zwischen 20°C und 28°C ansgezogen. Wahrscheinlich hat dieser Temperaturbereich auf die Adaptation der Pflanzen so gewirkt, dass die Pflanzen unter 30°C im Dauerlicht noch in der arrhythmischen Domäne waren. Leider wurden bei 33°C alle Versuchsblätter am Anfang von Dauerlicht abgestört, so dass der rhythmische Temperaturbereich nicht bestimmt werden konnte.

Die endogene Rhythmik von *C. minor* bei 25°C und 30°C hält jedoch nicht lange an, sondern die Oszillationen dämpften zum stabilen Zustand aus (Abb.3.12 und 3.13). Interessanterweise zeigten die Pflanzen bei den meisten Versuchstemperaturen nach der Rückkehr zum Hell/Dunkel-Rhythmus ein C<sub>3</sub>-Gaswechsellmuster. D. h., nach vielen Tagen im Dauerlicht zeigten die C<sub>3</sub>- adaptierten Pflanzen im Hell/Dunkel-Wechsel C<sub>3</sub>-Gaswechsellmuster, aber auch die CAM- adaptierten Pflanzen waren zum C<sub>3</sub>-Gaswechsel übergegangen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Ausdämpfen der circadianen Oszillationen in CAM-adaptierten Pflanzen direkt mit Herunterregulieren der CAM-Aktivität verbunden ist.

Aber woher kommt das oszillatorische Verhalten der C<sub>3</sub>- adaptierten Pflanzen? Bei den Versuchen unter 25°C (Abb. 3.14 und 3.15.) wurden die Chlorophyllfluoreszenz und die zeitliche Entwicklung der Effizienz des Photosystem II ( $\Delta F/F_m'$ ) parallel zu den Gaswechsellmessungen verfolgt. Diese

Kombination von Techniken ermöglichte es zu zeigen, dass erstaunlicherweise  $C_3$ -adaptierte Pflanzen, wie die CAM- adaptierten Pflanzen, die Fähigkeit hatten,  $CO_2$  zu konzentrieren. Am Anfang des ersten eigentlichen Tages im Dauerlicht sanken die  $CO_2$ -Aufnahme ( $J_{CO_2}$ ) und die stomatäre Leitfähigkeit ( $g_{H_2O}$ ) parallel zum Anstieg der internen  $CO_2$  Konzentration im Blattgewebe ( $p_{CO_2}^i$ ) und der Effizienz des Photosystem II ( $\Delta F/Fm'$ ). Dies beweist das Vorliegen einer restlichen CAM-Aktivität bei  $C_3$ -adaptierten Pflanzen, die nicht durch Säureanalyse detektiert wurde (siehe Teil 1 der Diskussion). De Mattos & Lüttge (2001) beobachteten bei *C. minor* Pflanzen unter einer Lichtintensität von ca.  $400 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  eine hohe Akkumulation von Citrat am Ende des Übergangs vom CAM- zum  $C_3$ -Gaswechsellmuster. Dies kann mit hoher Lichtintensität korreliert sein (Haag-Kerwer *et al.* 1992; Grams, 2002) im Gegensatz zu den vorliegenden Versuchen, wo die Lichtintensität um ca.  $120 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  betrug und der Citratgehalt zwischen 14 und  $20 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  lag. Die Möglichkeit, dass der Rhythmus im Dauerlicht in  $C_3$ - adaptierten Pflanzen von Citrat initiiert wäre, ist daher unwahrscheinlich. Die „versteckte“ CAM-Aktivität kann im Mesophyll der Hauptleitbündel liegen, weil die rel.  $\phi_{PSII}$  wie in CAM- adaptierten Pflanzen von *C. minor* schwankte (vorliegende Ergebnisse und auch De Mattos & Lüttge, 2001). Die CAM- adaptierten Pflanzen zeigten im Kontrast dazu mehrere Oszillationen von  $p_{CO_2}^i$  und  $\Delta F/Fm'$ . Dies zeigt, dass die hier so genannten „ $C_3$ -adaptierten Pflanzen“ eigentlich Pflanzen mit niedrigerem CAM- Potential sind als die CAM- adaptierten Pflanzen. Dieses Potential konnte nur im Dauerlicht wirklich beobachtet werden.

Die relative Photorespirationsrate ( $\% J_{O_2}$ ) im Dauerlicht hat sich zwischen  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen deutlich unterschieden (Abb. 3.16 und 3.18). Bei den ersteren folgt  $J_{O_2}$  dem Kurvenverlauf der Netto- $CO_2$ -Aufnahme ( $J_{CO_2}$ ) und der Leitfähigkeit des Blattes für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ). Bei den CAM- adaptierten Pflanzen befanden sich die Peaks von  $\% J_{O_2}$  beim Anstieg von  $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$ , d. h., wenn die Decarboxylierung von organischer Säure beendet war und  $g_{H_2O}$  wieder  $CO_2$  Diffusion in die Blätter erlaubte. Als Folge der Erniedrigung des  $CO_2:O_2$  Verhältnisses steigt die photorespiratorische Aktivität. Das entspricht dem Übergang von Phase III zu Phase IV im Tag/Nacht-Rhythmus. Der Peak von  $\% J_{O_2}$  verschwindet zusammen mit dem Ausklingen des Rhythmus, was auf ein Ende der Fähigkeit, organische Säuren zu produzieren und decarboxylieren, hinweist: PEPC wurde möglicherweise herunter reguliert. Ein kleiner Peak von  $\% J_{O_2}$  wurde beim Anfang des Rhythmus bei den  $C_3$ -adaptierten Pflanzen beobachtet und weist auf eine restliche CAM-Aktivität hin: die PEPC war wohl schon stark herunter reguliert, aber noch aktiv.

Die starken Oszillationen der rel.  $\phi_{PSII}$  bei den Applikationen von 1%  $O_2$  in  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen zeigten den kompensatorischen Effekt der photorespiratorischen Aktivität auf den

schwankenden Energiebedarf der Photosynthese im Dauerlicht, weil unter normaler Luft dieser Parameter konstant war. Mittels der Absenkung von  $O_2$  auf 1% konnte festgestellt werden, dass bei CAM- adaptierten Pflanzen der höchste Energiebedarf in einer endogenen Periode in den Peaks von  $J_{CO_2}$  und  $g_{H_2O}$  besteht. Dies kann so stark ausgeprägt sein, dass sich besonders bei den ersten Peaks fast kein Unterschied zwischen normaler Luft und Applikation von 1%  $O_2$  ergab (Abb. 3.16 und 3.18). Die durch photorespiratorische Aktivität verbrauchte Energie wurde zu anderen Reaktionen „umgeleitet“, und die Lichtreaktionen blieben insgesamt bei demselben Energiebedarf. Wenn man bedenkt, dass in den Peaks möglicherweise zwei Carboxylierungsprozesse stattfinden, kann dieser starke Energiebedarf erklärt werden. *C. minor* kann Malat und Citrat akkumulieren (Lüttge, 1998). Der Energiebedarf für jedes Mol  $CO_2$ -Fixierung ist höher bei Oszillationen mit Citrat als nur mit Malat. Die Stöchiometrie von ATP : NADPH :  $CO_2$  ist 4,8 : 3,2 : 1 für CAM mit Oszillationen von Malat und 5,9 : 3,9 : 1 für CAM mit Oszillationen von Malat und Citrat (Winter & Smith, 1996 *apud* Lüttge, 2004). Im Tag/Nacht-Rhythmus erfolgen die Malat- und Citrat- Produktion und der Transport in die Vakuole hauptsächlich im Dunkeln und verbrauchen respiratorische Energie. Im Dauerlicht kann dies auch von den Lichtreaktionen versorgt werden, aber bei gleichzeitiger Konkurrenz des Calvin Zyklus und der photorespiratorischen Reaktionen. Der niedrige Korrelationskoeffizient zwischen der maximalen Carboxylierungsrate ( $J_{CO_{2max}}$ ) und der rel.  $\phi_{PSII}$  unter Applikationen von Luft mit 1%  $O_2$  bei den CAM- adaptierten Pflanzen im Vergleich zu dem  $C_3$ -adaptierten Pflanzen unterstützt die Annahme einer Konkurrenz zwischen CAM- und  $C_3$ -Reaktionen.

Die Schwankungen der rel.  $\phi_{PSII}$  bei den Applikationen von Luft mit 1%  $O_2$  verschwinden mit der Zeit im Dauerlicht. Jedoch erfolgt dies bei mittleren Werten, wenn das CAM- Potential abgeschwächt ist. Dies bedeutet, dass im Bereich der Tiefpunkte der rel.  $\phi_{PSII}$  Oszillationen der Energiebedarf der Photosynthese geringer war als es nach Ausklingen der Oszillationen bei reiner  $C_3$ -Photosynthese der Fall wäre. Es weist darauf hin, dass der  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus, trotz seines Effekts als  $O_2$ -Konzentrierungsmechanismus (Lüttge, 2002), das  $CO_2:O_2$  Verhältnis erhöht und die Carboxylaseaktivität der RUBISCO begünstigt. Dadurch wird zusätzlich weniger Konkurrenz um die Energie der Lichtreaktionen des Calvin-Zyklus mit den  $C_4$ -Reaktionen erwartet.

Die Nutzung der Applikation von Luft mit 1%  $O_2$  hat nicht nur die Komplexität der photosynthetischen Prozesse im Dauerlicht offenbart, sondern auch im Zusammenspiel mit der Chlorophyllfluoreszenzkamera ihre zeitlich-räumliche Dynamik gezeigt. Da die CAM- adaptierten Pflanzen im Dauerlicht in den  $C_3$  - Zustand zurückkehrten (siehe Kap.: 3.3.1), weist das Abklingen des oszillatorischen Verhaltens des Heterogenitätsmaßes darauf hin, dass in *C. minor* das zeitlich-

räumliche Phänomen der rel.  $\phi_{PSII}$  eine Eigenschaft des endogenen Rhythmus des CAM ist. Dieses Argument wird noch durch die oszillatorische Dynamik des Heterogenitätsmaßes unterstützt. Die große Phase der Desynchronisation der photosynthetischen Reaktionen (hohes Heterogenitätsmaß) während des endogenen Rhythmus in den CAM- adaptierten Pflanzen erfolgte beim Anstieg von  $J_{CO_2}$ ,  $g_{H_2O}$  und rel.  $\phi_{PSII}$  und wenn die prozentuale photorespiratorische Aktivität besonderes hoch war. Bei der  $C_3$ - adaptierten Pflanze war dies nicht so stark ausgeprägt. Die Entkopplung und Desynchronisation der photosynthetischen Reaktionen begannen noch während der Peaks, aber die Phase der Wiederkopplung, (Resynchronisation), hing völlig vom Adaptationszustand der Pflanze ab. Dies wiederholte sich bei der CAM- adaptierten Pflanze in vier aufeinander folgenden Perioden, im Vergleich zu nur einer erkennbaren Periode bei der  $C_3$ -adaptierten Pflanze. Zusätzlich hängt das zeitlich-räumliche Phänomen der rel.  $\phi_{PSII}$  nicht nur von Desynchronisation / Resynchronisation von CAM-Phasen, sondern auch von CAM-Amplituden ab, weil *C. minor* eine intermediäre  $C_3$ -CAM-Pflanze ist und unterschiedliche Blattteile unterschiedliche CAM-Potentiale haben können.

Zeitlich-räumlich Phänome zusammen mit Desynchronisations- und Resynchronisationsprozessen zwischen Blattteilen wurden früher bei der obligaten CAM-Pflanze *K. daigremontiana* demonstriert (Rascher *et al.* 2001; Rascher und Lüttge 2002). Das heterobarische Verhalten als Ursache des Widerstands gegen die laterale Gasdiffusion wegen der dichten Blattanatomie dieser Art (Maxwell *et al.*, 1997) kann Heterogenität in der rel.  $\phi_{PSII}$  erzeugen, wenn unterschiedliches  $p_{CO_2}^i$  zwischen Blattteilen artifiziell erzeugt wird (Duarte *et al.* 2005). Dagegen ist jedoch die Anatomie von *C. minor*  $C_3$ -typisch. Dies bedeutet, dass der Verbrauch der Energie beim Zusammenspiel zwischen Calvin-Zyklus und CAM-Aktivität (hauptsächlich durch PEPC-Aktivität und Malat-Decarboxylierung) der Hauptgrund für die Heterogenität der PSII-Aktivität in *C. minor* ist.

In normaler Luft und im Tag/Nacht-Rhythmus hatte der Kurvenverlauf der rel.  $\phi_{PSII}$  auf dem Hauptleitbündel bei beiden Photosynthesemodi eine größere Amplitude als auf dem Interkostalfeld (Abb. 3.4 und 3.6). Da die beiden Blattteile sich in ihren Interzellularräumen unterscheiden, kann man die Frage stellen, wie die Blattanatomie den endogenen CAM-Rhythmus beeinflusst. Im Dauerlicht zeigte sich in normaler Luft bei beiden Blattteilen und Photosynthese- Modi dasselbe Phänomen wie im Tag/Nacht-Rhythmus: die Oszillationsamplitude der rel.  $\phi_{PSII}$  auf den Hauptleitbündeln ist größer (Abb.3.21). Es ist jetzt die Frage, ob diese Amplitude der Energienutzung der Amplitude des photosynthetischen Bedarfs entspricht. Hier war wiederum die Hemmung der photorespiratorischen Aktivität durch 1%  $O_2$  nützlich, um diese Frage zu beantworten. Bei den Applikationen von Luft mit 1%  $O_2$  zeigte der Kurvenverlauf bei  $C_3$ - und CAM- adaptierten Pflanzen nicht nur kleinere Amplituden

der Oszillationen der rel.  $\phi_{PSII}$  auf dem Hauptleitbündel sondern auch, dass der Pegel der Schwankungen bei einem niedrigeren Wert lag als im Interkostalfeld (Abb. 3.21). Die photorespiratorische Aktivität auf den Hauptleitbündeln war wesentlich größer als beim Interkostalfeld. Außerdem gab es eine leichte Phasenverschiebung der Oszillationen der rel.  $\phi_{PSII}$  auf dem Hauptleitbündel bei CAM- adaptierten Pflanzen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die durch Trockenstress zum CAM- adaptierten *Clusia minor* Pflanzen, zeigten typische Eigenschaften dieses Photosynthesemodus: die vier Phasen des CO<sub>2</sub>-Austausches und der stomatären Leitfähigkeit, Tag/Nacht-Änderungen im Malatgehalt, typische Variationen der rel.  $\phi_{PSII}$  und dynamische zeitlich-räumliche Muster in Bildern der rel.  $\phi_{PSII}$ . Zusätzlich wurde auch gezeigt, dass die räumliche Struktur der Caboxylaseaktivität der RUBISCO in *C. minor* durch die CAM-Phasen gesteuert wird.

C<sub>3</sub>-adaptierte Pflanzen zeigten keine deutlichen Tag/Nacht Änderungen im Säuregehalt. Die Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme und stomatäre Leitfähigkeit im Licht waren typisch für C<sub>3</sub>-Pflanzen, aber im Dunkeln blieben diese Parameter nahe Null, d. h. es trat keine Netto-CO<sub>2</sub>-Abgabe auf. Dies, zusammen mit der Schwankung der rel.  $\phi_{PSII}$  unter nicht photorespiratorischen Bedingungen, weist darauf hin, dass im C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen eine CAM-Aktivität übrig geblieben sein könnte. Unter nicht photorespiratorischen Bedingungen ist die räumliche Struktur der Caboxylaseaktivität der RUBISCO während des Tag/Nacht-Rhythmus konstant. Dies spricht dafür, dass Blätter von *C. minor* heterobar sind.

Blätter von C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Pflanzen zeigen im Bereich der Hauptleitbündel im Tagesgang eine deutlich größere Amplitude der rel.  $\phi_{PSII}$  als im Bereich des Interkostalfeldes. Solches Verhalten der PSII- Aktivität ist charakteristisch für CAM und bei C<sub>3</sub>-adaptierten Pflanzen weist es auf lokale CAM-Aktivität hin. Diese könnte durch die im Bereich der Hauptleitbündel dichtere Packung der Mesophyllzellen begründet sein.

Endogene Rhythmik des Gaswechsels und der Chlorophyllfluoreszenzparameter wurde in C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierten Blättern von *C. minor* gefunden. Sie war temperaturkompensiert. Bei dem CAM- adaptierten Blättern klangen die Gaswechselrhythmen im Dauerlicht schnell aus und wurden durch einen für C<sub>3</sub>-Photosynthese typischen Gaswechsel ersetzt. C<sub>3</sub>-adaptierte Pflanzen enthalten immer ein gewisses CAM- Potential und zeigen im Dauerlicht weniger Perioden des für diesen Photosynthesemodus typischen Gaswechsels. Die Gaswechsel-Rhythmen starben immer verbunden mit einem Wechsel vom CAM zur C<sub>3</sub>-Photosynthese aus.

C<sub>3</sub>- und CAM- adaptierte Pflanzen unterscheiden sich beim Verlauf der photorespiratorischen Aktivität und bei der Energienutzung der photosynthetischen Reaktionen. Der hohe Energiebedarf in den Peaks der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme weist auf eine Konkurrenz um die Energie der Lichtreaktionen zwischen der C<sub>3</sub>- und CAM- Carboxylierung und auch der Photorespiration hin. Diese Konkurrenz verschwindet in den Tiefpunkten der Netto-CO<sub>2</sub>-Aufnahme, wenn Malat-Decarboxylierung abläuft.

Circadiane zeitlich-räumliche Phänomene sind für die CAM Photosynthese charakteristisch und kommen hauptsächlich aus dem Zusammenspiel zwischen C<sub>3</sub>- und CAM-Reaktionen im Dauerlicht und aus möglicherweise unterschiedlichen CAM- Potentialen in verschiedenen Blattteilen.

Die Photorespiration stabilisiert das Niveau der Energienutzung der Photosynthese und garantiert einen homogenen Elektrontransport während der Synchronisations / Desynchronisations- Prozesse im Dauerlicht.

Die Blattanatomie beeinflusst hauptsächlich die Amplitude der rel.  $\phi_{PSII}$ -Rhythmik unter normaler Luft.

## 6 LITERATUR

- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639.
- Ball E, Hann J, Kluge M, Lee HSJ, Lüttge U, Orthen B, Popp M, Schmitt A, Ting IP (1991). Ecophysiological comportment of the tropical CAM-tree *Clusia* in the field. I. Growth of *Clusia rosea* Jacq. on St. John, US Virgin Islands, Lesser Antilles. *New Phytol* 117: 473–481.
- Bastide B, Sipes D, Hann J, Ting IP (1993) Effect of severe water stress on aspects of crassulacean acid metabolism in *Xerosicyos*. *Plant Physiol* 103: 1089–1096.
- Beck F, Blasius B, Lüttge U, Neff R, Rascher U (2001) Stochastic noise interferes coherently with biological clocks and produces specific time structures. *Proc Royal Soc B* 268: 1307–1313.
- Berg A, Orthen B, Mattos EA, Duarte HM & Lüttge U (2004) Expression of crassulacean acid metabolism in *Clusia hilariana* Schlechtendal in different stages of development in the field. *Trees* 18: 553–558.
- Beyschlag W, Eckstein J (1997) Stomatal patchiness. *Prog Bot* 59: 283–298.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25: 173–185.
- Blasius B, Beck F, Lüttge U (1997) A model for photosynthetic oscillations in crassulacean acid metabolism (CAM). *J Theor Biol* 184: 345–351.
- Blasius B, Beck F, Lüttge U (1998) Oscillatory model of Crassulacean acid metabolism: structure analysis and stability boundaries with a discrete hysteresis switch. *Plant Cell Environ* 21: 775–784.
- Blasius B, Neff R, Beck F, Lüttge U (1999) Oscillatory model of crassulacean acid metabolism with a dynamic hysteresis switch. *Proc R Soc London Ser B* 266: 93–101.



- Bohn A, Geist A, Rascher U, Lüttge U (2001) Responses to different external light rhythms by the circadian rhythm of Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë daigremontiana*. Plant, Cell Env 24: 811-820.
- Bohn A, Rascher U, Hütt MT, Kaiser F and Lüttge U (2002) Responses of a plant circadian rhythm to thermoperiodic perturbations with asymmetric temporal patterns and the rate of temperature change. Biol Rhythm Res 33: 151-170.
- Borland A, Taybi T (2004) Synchronization of metabolic processes in plants with Crassulacean acid metabolism. J Exp Bot 55: 1255-1265.
- Borland AM, Griffiths H (1996) Variations in the phases of crassulacean acid metabolism and regulation of carboxylation patterns determined by carbon-isotope-discrimination techniques. In: Winter K, Smith JAC (eds) Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution. Ecological Studies, Vol. 114. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 230-249.
- Borland AM, Griffiths H, Broadmeadow MSJ, Fordham MC, Maxwell C (1994). Carbon-isotope composition of biochemical fractions and the regulation of carbon balance in leaves of the C<sub>3</sub>-crassulacean acid metabolism plant *Clusia minor* L. growing in Trinidad. Plant Physiol 106: 493-501.
- Borland AM, Griffiths H, Broadmeadow MSJ, Fordham MC, Maxwell C (1993) Short-term changes in carbon isotope photochemical chlorophyll fluorescence quenching. I. The discrimination in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate *Clusia minor* L. growing in Trinidad. Oecologia 95: 444-53.
- Borland AM, Griffiths H, Maxwell C, Broadmeadow MSJ, Fordham MC (1996) CAM induction in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season in Trinidad: the role of organic acid speciation and decarboxylation. Plant, Cell and Env 19: 655-64.
- Borland AM, Griffiths H, Maxwell C, Broadmeadow MSJ, Griffiths NM, Barnes JD (1992) On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: expression of CAM in *Clusia minor* during the transition from wet to dry season and characterisation of three endemic species. New Phytol 122: 349-57.
- Borland AM, Griffiths H. (1997) A comparative study on the regulation of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> carboxylation in the constitutive crassulacean acid metabolism (CAM) plant *Kalanchoë daigremontiana* and the C<sub>3</sub>-CAM intermediate *Clusia minor*. Planta 201: 368-78.

- Borland AM, Hartwell J, Jenkins GI, Wilkins MB, Nimmo HG (1999) Metabolite control overrides circadian regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and CO<sub>2</sub> fixation in Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 121: 889–896 .
- Borland AM, Tecsí LI, Leegood RC, Walker RP (1998) Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; Physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta* 205: 342–351.
- Boxall SF, Foster JM, Bohnert HJ, Cushman JC, Nimmo HG, Hartwell J (2005) Conservation and divergence of circadian clock operation in a stress-inducible crassulacean acid metabolism species reveals clock compensation against stress. *Plant Physiol* 137: 969–982.
- Buchanan-Bollig IC (1984) Circadian rhythms in *Kalanchoë*: effects of irradiance and temperature on gas exchange and carbon metabolism. *Planta* 160: 264–271.
- Buchanan-Bollig IC, Kluge M (1981). Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoë daigremontiana*: temperature response of phosphoenolpyruvate (PEP) - carboxylase in relation to allosteric effectors. *Planta* 152: 181–188.
- Buchanan-Bollig IC, Smith JAC (1984) Circadian rhythms in crassulacean acid metabolism: phase relationships between gas exchange, leaf water relations and malate metabolism in *Kalanchoë daigremontiana*. *Planta* 161, 314–319.
- Bünning E (1953): Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin, Springer-Verlag.
- Bünning E, Tazawa M (1957) Über den Temperatureinfluß auf die endogene Tagesrhythmik bei *Phaseolus*. *Planta* 50:107–121.
- Carter PJ, Nimmo HG, Fewson CA, Wilkins MB (1991) Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J* 10: 2063–2068.
- Carter PJ, Wilkins MB, Nimmo HG, Fewson CA (1995) Effects of temperature on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and on the control of CO<sub>2</sub> fixation in *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Planta* 196: 375–380.
- Chu C, Dai Z, Ku MSB, Edwards GE (1990) Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiol* 93: 1253–1260.

- Cockburn W, Whitelam GC, Broad A, Smith J (1996) The participation of phytochrome in the signal transduction pathway of salt stress responses in *Mesembryanthemum crystallinum* L. J Exp Bot 47: 647-653.
- Conti S, Smirnoff N (1994) Rapid triggering of malate accumulation in the C<sub>3</sub>/CAM intermediate plant *Sedum telephium*: relationship with water status and phosphoenolpyruvate carboxylase. J Exp Bot 45, 1613-1621.
- Cowan IR (1977) Stomatal behaviour and environment. Adv Bot Res 117-228.
- Cushman JC (2001) Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. Plant Physiol 127:1439-1448.
- Cushman JC, Michalowski CB, Bohnert HJ (1990) Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. Plant Physiol 94: 1137-1142.
- Dai Z, Ku MSB, Zhang Z, Edwards GE (1994) Effects of growth regulators on the induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta 192: 287-294.
- de Mattos E, Herzog B, Lüttge U (1999). Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress. J Expl Bot 50: 253-261.
- de Mattos EA, Grams TEE, Ball E, Franco AC, Haag-Kerwer A, Herzog B, Scarano FR, Lüttge U (1997) Diurnal patterns of chlorophyll *a* fluorescence and stomatal conductance in species of two types of costal tree vegetation in southeastern Brazil. Trees 11: 363-369.
- Demmig-Adams B, Adams III W (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. Planta 198: 460-470.
- Dodd AN, Griffiths H, Taybi T, Cushman JC, Borland AM (2003) Integrating diel starch metabolism with the circadian and environmental regulation of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. Planta 216: 789-797.
- Duarte HM, Jakovljevic I, Kaiser F, Lüttge U (2005) Lateral diffusion of CO<sub>2</sub> in leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier. Planta 220: 809-816.

- Eastmond PJ, Ross JD (1997) Evidence that the induction of Crassulacean acid metabolism by water stress in *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) involves root signalling. *Plant Cell Environ* 20: 1559-1565.
- Edwards GE, Dai Z, Cheng SH, Ku MSB (1996) Factors affecting the induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution*. Ecological Studies, Vol. 114. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 119-134.
- Farquhar, G. D. & Sharkey T. D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol* 33: 317-345.
- Franco AC, Ball E, Lüttge U (1991) The influence of nitrogen, light and water stress on CO<sub>2</sub> exchange and organic acid accumulation in the tropical C<sub>3</sub>-CAM tree, *Clusia minor*. *J Exp Bot* 42: 597-603.
- Franco AC, Ball E, Lüttge U (1991). Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. *Oecol* 85: 108-114.
- Franco AC, Ball E, Lüttge U (1992). Differential effects of drought and light levels on accumulation of malic and citric acids during CAM in *Clusia*. *Plant Cell Env* 15: 820-829.
- Franco AC, Haag-Kerwer A, Herzog B, Grams TEE, Ball E, de Mattos EA, Scarano FR, Barreto S, Garcia MA, Mantovani A, Lüttge U (1996) The effects of light levels on daily patterns of chlorophyll a fluorescence and organic acid accumulation in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Trees* 10: 359-365.
- Franco AC, Herzog B, Hübner C, Mattos EA de, Scarano FR, Ball E, Lüttge U (1999) Diurnal changes in chlorophyll a fluorescence, CO<sub>2</sub>-exchange and organic acid decarboxylation in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. *Tree Physiol* 19: 635-644.
- Franco AC, Olivares E, Ball E; Lüttge U, Haag-Kerwer A (1994) In situ studies of crassulacean acid metabolism in several sympatric species of tropical trees of the genus *Clusia*. *New Phytol* 126: 203-211.
- Friemert V, Heininger D, Kluge M, Ziegler H (1988) Temperature effects on malic-acid efflux from the vacuoles and on the carboxylation pathways in Crassulacean acid metabolism plants. *Planta* 171:453-461.

- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM & Baker NR (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves J Exp Bot 53: 1249-1254.
- Genty B, Briantais JM and Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim Biophys Acta 990: 87-92.
- Giuliano G, Hoffman NE, Ko K, Scolnik PA, Cashmore AR (1988) A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. EMBO J 7: 3635-3642.
- Grams TEE, Beck F, Lüttge U (1996) Generation of rhythmic and arrhythmic behaviour of crassulacean acid metabolism in *Kalanchoë daigremontiana* under continuous light by varying the irradiance or temperature: measurements in vivo and model simulations. Planta 198: 110-117.
- Grams TEE, Borland AM, Roberts A, Griffiths H, Beck F, Lüttge U (1997) On the mechanism of reinitiation of endogenous crassulacean acid metabolism by temperature changes. Plant Physiol 113:1309-1317.
- Grams TEE, Herzog B, Lüttge U (1998) Are there species in the genus *Clusia* with obligate C<sub>3</sub>-photosynthesis? J Plant Physiol 152: 1-9.
- Grams TEE, Thiel S. (2002) High light-induced switch from C<sub>3</sub>-photosynthesis to Crassulacean acid metabolism is mediated by UV-A/blue light. J Exp Bot 53: 1475-1483.
- Groenhof AC, Smirnoff N, Bryant JA (1990). The appearance of a new molecular species of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and the rapid induction of CAM in *Sedum telephium* L. Plant, Cell Env 13: 437-445.
- Guralnick LJ, Edwards G, Ku MSB, Hockema B, Franceschi VR (2002) Photosynthetic and anatomical characteristics in the C<sub>4</sub>-crassulacean acid metabolism-cycling plant, *Portulaca grandiflora*. Func Plant Biol 29: 763-773.
- Haag-Kerwer A, Franco AC, Lüttge U (1992). The effect of temperature and light on gas exchange and acid accumulation in the C<sub>3</sub>-CAM plant *Clusia minor* L. J Exp Bot 43: 345-352.
- Haag-Kerwer A, Grams TEE, Olivares E, Ball E, Arndt S, Popp M, Medina E, Lüttge U (1996) Comparative measurements of gasexchange, acid accumulation and chlorophyll *a* fluorescence at different

- species of *Clusia* showing  $C_3$ -photosyntheses or crassulacean acid metabolism, at the same field site in Venezuela. *New Phytol* 134: 215-226.
- Harmer SL, Kay SA (2005) Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1926-1940.
- Hartwell J, Gill A, Nimmo GA, Wilkins MB, Jenkins GL, Nimmo HG (1999) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. *Plant J* 20:333-342.
- Hartwell J, Smith LH, Wilkins MB, Jenkins GL, Nimmo HG (1996) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is regulated at the level of translatable mRNA in response to light or a circadian rhythm. *Plant J* 10: 1071-1078.
- Hastings JW, Sweeney BM (1960) The action spectrum for shifting the phase of the rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J. Gen Physiol* 43: 697-706.
- Heber U (2002) Irrungen, Wirungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in  $C_3$  plants. *Photosyn Res* 73: 223-231.
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayashi Y and Lange OL (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *J Exp Bot* 52: 1999-2006.
- Heldt HW (2003) *Pflanzenbiochemie*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg-Berlin 2003.
- Hennesey TL, Field CB (1991) Circadian rhythms in photosynthesis. Oscillations in carbon assimilation and stomatal conductance under constant conditions. *Plant Physiol* 96: 831-836.
- Herppich W, Herppich M, von Willert DJ (1992) The irreversible  $C_3$  to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control. *Bot Acta* 105: 34-40.
- Herzog B, Hoffmann S, Hartung W, Lüttge U (1999) Comparison of photosynthetic responses of the sympatric tropical  $C_3$ -species *Clusia multiflora* H.B.K. and the  $C_3$ -CAM intermediate species *Clusia minor* L. to irradiance and drought stress in a phytotron. *Plant Biol* 1: 460-470.

- Hütt MT, Neff R (2001) Quantification of spatiotemporal phenomena by means of cellular automata techniques. *Physica A* 289: 498-516.
- Hütt, M.T., Rascher, U., Beck, F., and Lüttge, U. (2002). Period-2 cycles and 2:1 phase locking in a biological clock driven by temperature pulses. *J. Theor. Biol.* 217, 383 – 390.
- Jähnig F (1977) Ordnung in Lipidmembranen. Habilitation Thesis, Göttingen.
- Jähnig F (1979) Molecular theory of lipid membrane order. *J Chem Phys* 70 3279-3290.
- Jones CS, Cardon CG, Czaja AD (2003) A phylogenetic view of low-level CAM in *Pelargonium* (Geraniaceae). *Am J Bot* 90: 135–142.
- Kliemchen A, Schomburg M, Galla H-J, Lüttge U, Kluge M. 1993. Phenotypic changes in the fluidity of the tonoplast membrane of crassulacean-acid-metabolism plants in response to temperature and salinity stress. *Planta* 189: 403-409.
- Kluge M, Böhlke C, Queiroz O (1981) Crassulacean acid metabolism (CAM) in *K. daigremontiana*. Changes in intercellular CO<sub>2</sub> concentration during a normal CAM cycle and during cycles in continuous light or darkness. *Planta* 152: 87–92
- Kluge M, Kliemchen A, Galla H-J (1991) Temperature effects on crassulacean acid metabolism: EPR spectroscopic studies on the thermotropic phase behaviour of the tonoplast membranes of *Kalanchoe daigremontiana*. *Bot Acta* 104: 355-360.
- Kluge M, Razanoelisoa B, Brulfert J (2001) Implications of genotypic diversity and phenotypic plasticity in the ecophysiological success of CAM plants, examined by studies on the vegetation of Madagascar. *Plant Biol* 3: 214-222.
- Lee HSJ, Lüttge U, Medina E, Smith JAC, Cram WJ, Diaz M, Griffiths H, Popp M, Schäfer C, Stimmel K-H, Thonke B (1989) Ecophysiology of xerophytic and halophytic vegetation of a coastal alluvial plain in northern Venezuela. III. *Bromelia humilis* Jacq. A terrestrial CAM bromeliad. *New Phytol* 111: 253-271.
- Liebig M, Scarano FR, Mattos de EA, Zaluar HLT, Lüttge U. 2001. Ecophysiological and floristic implications of sex expression in the dioecious neotropical CAM tree *Clusia hilariana* Schltdl. *Trees* 15: 278-288.

- Lüttge L (1988) Day-night changes of citric-acid levels in crassulacean acid metabolism: phenomenon and ecophysiological significance. *Plant, Cell and Environ* 11: 445–451.
- Lüttge U (1996) *Clusia*: plasticity and diversity in a genus of C<sub>3</sub>/CAM intermediate tropical trees. In: Winter K, Smith JAC (eds) *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution*. Ecological Studies vol. 114. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 296–311.
- Lüttge U (2000) Light-stress and crassulacean acid metabolism. *Phyton* 40: 65–82.
- Lüttge U (2000) The tonoplast functioning as the master switch for circadian regulation of Crassulacean acid metabolism. *Planta* 211: 761–769.
- Lüttge U (2002a) Circadian rhythmicity: Is the "biological clock" hardware or software? *Progr Bot* 64: 277–319.
- Lüttge U (2002b) CO<sub>2</sub>-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. *J Exp Bot* 53: 2131–2142.
- Lüttge U (2004) Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) *Ann Bot* 93: 629–652.
- Lüttge U, Ball E (1978) Free running oscillations of transpiration and CO<sub>2</sub> exchange in CAM plants without a concomitant rhythm of malate levels. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 90: 69–77.
- Lüttge U, Beck F (1992) Endogenous rhythms and chaos in crassulacean acid metabolism. *Planta* 188: 28–38.
- Lüttge U, Beck F (1992) Endogenous rhythms and chaos in crassulacean acid metabolism. *Planta* 188: 28–38.
- Lüttge U, Grams TEE, Hechler B, Blasius B, Beck F (1996) Resonance of the basic frequency of the circadian rhythm of CAM and its harmonic overtones in *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier de la Bâthie under external temperature rhythms of varied period lengths in continuous light. *Bot Acta* 109: 422–426.
- Lüttge U, Smith AC (1984) Mechanism of passive malic-acid efflux from vacuoles of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana*. *J Membr Biol* 81: 149–158.
- Mattos EA, Lüttge U. 2001. Chlorophyll fluorescence and organic acid oscillations during transition from CAM to C<sub>3</sub>- photosynthesis in *Clusia minor* L. (Clusiaceae). *Annals of Botany* 88: 457–463.



- Maxwell K, von Caemmerer S, Evans JR (1997) Is a low internal conductance to CO<sub>2</sub> diffusion a consequence of succulence in plants with crassulacean acid metabolism. *Aust J Plant Physiol* 24:777–786.
- Mayer W, Hohloch C, Kalkuhl A (1997) Extensor protoplasts of the *Phaseolus pulvinus* : light-induced swelling may require extracellular Ca<sup>2+</sup> influx, dark-induced shrinking inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J Exp Bot* 48: 219–228.
- McElwain EF, Bohnert HJ, Thomas JC (1992) Light moderates the induction of phosphoenolpyruvate carboxylase by NaCl and abscisic acid in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 99: 1261–1264.
- Meyer S, Genty B (1998) Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (c<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. Significance of c<sub>i</sub> estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiol* 116: 947–957.
- Miszalski Z, Niewiadomska E, Slesak I, Lüttge U, Kluge M, Ratajczak R (2001) The effect of irradiance on carboxylating/decarboxylating enzymes and fumarase activities in *Mesembryanthemum crystallinum* L. exposed to salinity stress. *Plant Biology* 3, 17–23.
- Mojzsis SJ, Arrhenius G, McKeegan KD, Harrison TM, Nutman AP, Friend CR (1996) Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature*: 384:55–9.
- Möllering H (1974) L-Malate. Bestimmung mit Malat-Dehydrogenase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. In: Bergmeyer HW (ed) *Methoden der enzymatischen Analyse*, Vol 25. Verlage Chemie, Weinheim pp 1636–1639.
- Möllering H (1985) Citrate. Determination with citrate lyase, MDH and LDH. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press pp 2–12.
- Nassoury N, Fritz L, Morse D (2001) Circadian changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase distribution inside individual chloroplasts can account for the rhythm in dinoflagellate carbon fixation. *The Plant Cell* 13: 923–934.
- Neff R, Blasius B, Beck F, Lüttge U (1998) Thermodynamics and energetics of the tonoplast membrane operating as a hysteresis switch in an oscillatory model of crassulacean acid metabolism. *J Membr Biol* 165: 37–43.

- Nelson EA, Sage TL, Sage RF (2005) Functional leaf anatomy of plants with crassulacean acid metabolism *Func Plant Biol* 32: 409-419.
- Nimmo GA, Nimmo HG, Fewson CA, Wilkins MB (1984) Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: a possible covalent modification. *FEBS Lett* 179: 199-203.
- Nimmo GA, Nimmo HG, Hamilton ID, Fewson CA, Wilkins MB (1986) Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Biochem J* 239: 213-220.
- Nimmo HG (2000) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends Plant Sci* 5:75-80.
- Nuernbergk EL (1961) Endogener Rhythmus und CO<sub>2</sub>- Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalem Saurerhythmus. *Planta* 56: 28-70.
- Nungesser D, Kluge M, Tolle H, Oppelt W (1984) A dynamic computer model of the metabolic and regulatory processes in crassulacean acid metabolism. *Planta* 162: 204-214.
- Osmond B, Schwartz O and Gunning B (1999) Photoinhibitory printing on leaves, visualized by chlorophyll fluorescence imaging and confocal microscopy, is due to diminished fluorescence from grana. *Aust J Plant Physiol* 26: 717-724.
- Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 379-414.
- Osmond CB and Grace CE (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J Exp Bot* 46: 1351-1362.
- Osmond CB, Daley PF, Badger MR and Lüttge U (1998). Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. infected with Abutilon mosaic virus, observed with a field-portable imaging system. *Bot Acta* 111: 390-397.
- Oxborough K (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J Exp Bot* 55: 1195-1205.

- Pfeffer W (1907) Untersuchungen über die Entstehung der Schlafbewegungen der Blattorgane. Teubner, Leipzig.
- Pilgrim ML, McClung CR (1993) Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 103:553–564.
- Popp M, Kramer D, Lee H, Diaz M, Ziegler H, Lüttge U (1987). Crassulacean acid metabolism in tropical dicotyledonous trees of the genus *Clusia*. Trees 1: 238–247
- Rascher U, Blasius B, Beck F, Lüttge U (1998) Temperature profiles for the expression of endogenous rhythmicity and arrhythmicity of CO<sub>2</sub> exchange in the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana* can be shifted by slow temperature changes. Planta 207: 76–82
- Rascher U, Hütt MT, Siebke K, Osmond B, Beck F, Lüttge U (2001) Spatiotemporal variation of metabolism in a plant circadian rhythm: the biological clock as an assembly of coupled individual oscillators. Proc Natl Acad Sci USA 98:11801–11805.
- Rascher U, Lüttge U (2002) High-resolution chlorophyll fluorescence imaging serves as a non-invasive indicator to monitor the spatio-temporal variations of metabolism during the day–night cycle and during the endogenous rhythm in continuous light in the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana*. Plant Biol 4:671–681.
- Reddy RA, Sundar D, Gnanam A (2003) Photosynthetic flexibility in *Pedilanthus tithymaloides* Poit, a CAM plant. J. Plant Physiol 160: 75–80.
- Roberts A, Borland AM, Griffiths H (1997) Discrimination processes and shifts in carboxylation during the Phases of crassulacean acid metabolism. Plant Physiol 113, 1283–1292.
- Roberts A, Borland AM, Maxwell K, Griffiths H (1998) Ecophysiology of the C<sub>3</sub>-CAM intermediate *Clusia minor* L. in Trinidad: seasonal and short-term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. J Exp Bot 49, 1563–1573.
- Roberts A, Griffiths H, Borland AM, Reinert F (1996) Is crassulacean acid metabolism activity in sympatric species of hemi-epiphytic stranglers such as *Clusia* related to carbon cycling as a photoprotective process? Oecol 106: 28–38.
- Roenneberg T, Morse D (1993) Two Circadian Oscillators in one Cell. Nature 362: 362–364.

- Scarano FR, Duarte HM, Franco AC, Geßler A, Mattos de EA, Nahm M, Rennenberg H, Zaluvar HLT, Lüttge U (2005) Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE - Brazil. I. Performance of three different species of *Clusia* in an array of plant communities. *Trees* 19: 497-509.
- Scarano FR, Duarte HM, Ribeiro KT, Rodrigues PJFP, Barcellos EMB, Franco AC, Brulfert J, Deléens E & Lüttge U (2001) Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geographic distribution to ecophysiological parameters. *Bot J Linn Soc* 136: 345-364.
- Schmid R, Dring MJ (1996) Influence of carbon supply on the circadian rhythmicity of photosynthesis and its stimulation by blue light in *Ectocarpus siliculosus*: clues to the mechanism of inorganic carbon acquisition in lower brown algae. *Plant Cell Env* 19: 373-382.
- Schmitt JM, Fisslthaler B, Sheriff A, Lenz B, Bässler M, Meyer G (1996) Environmental control of CAM induction in *Mesembryanthemum crystallinum*: a role for cytokinin, abscisic acid and jasmonate? In K Winter, JAC Smith (eds) *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, Vol 114. Springer-Verlag, Berlin 159-175.
- Schreiber U, Bilger W (1993) Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progr Bot* 54: 151-173.
- Schreiber U, Bilger W and Schliwa U (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62.
- Schreiber U, Hormann H, Asada K and Neubauer C (1995) O<sub>2</sub>-dependent electron flow in spinach chloroplasts: Properties and possible regulation of the Mehler-Ascorbate Peroxidase Cycle. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. Mathis P (ed) Vol. II Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 813-818.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:627-658.
- Siebek K, Weis E (1995) Assimilation images of leaves of *Glechoma hederacea*: analysis of non-synchronous stomata related oscillations. *Planta* 196, 155-165.

- Somers DE, Webb AAR, Pearson M, Kay SA (1998) The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:485–494.
- Taybi T, Cushman JC (1999) Signalling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Physiol* 121: 545–555.
- Taybi T, Nimmo HG, Borland AM. (2004) Expression of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and PEPC kinase genes: implications for genotypic capacity and phenotypic plasticity in the expression of crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 135: 587–598.
- Taybi T, Patil S, Chollet R, Cushman JC (2000) A minimal serine/ threonine protein kinase circadianly regulates phosphoenolpyruvate carboxylase activity in Crassulacean acid metabolism-induced leaves of the common ice plant. *Plant Physiol* 123: 1471–1481.
- Taybi T, Sotta B, Gehrig HH, Güclü S, Kluge M, Brulfert J. (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoë blossfeldiana*. *Botanica Acta* 198, 240–246.
- Tice MM, Lowe ADR (2004) Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean *Nature* 431: 549 – 5521.
- Ting IP (1985) Crassulacean acid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 595–622.
- Ting IP, Hann J, Holbrook NM, Putz FE, Sternberg LDSK, Price D, Goldstein G (1987) Photosynthesis in hemiepiphytic species of *Clusia* and *Ficus*. *Oecol* 74: 339–346.
- Tinoco OC, Vazquez-Janez C (1983) Especies CAM in la selva húmeda tropical de los Tuxtlas, Veracruz. *Boletín de la Sociedad México de Botánico* 45, 150–153.
- Warren DM, Wilkins MB (1961) An endogenous rhythm in the rate of dark fixation of carbon dioxide in leaves of *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Nature* 191: 686–688.
- Wilkins MB (1959) An endogenous rhythm in the rate of dark fixation of carbon dioxide in leaves of *Bryophyllum*. 11. The effects of light and darkness on the phase and period of the rhythm. *J Exp Bot* 10: 377–390.

- Wilkins MB (1960) An endogenous rhythm in the rate of dark fixation of carbon dioxide in leaves of *Bryophyllum* II. The effects of light and darkness on the phase and period of the rhythm. J Exp Bot 11: 269-288.
- Wilkins MB (1984) A rapid circadian rhythm of carbon-dioxide metabolism in *Bryophyllum fedtschenkoi*. Planta 161: 381-384.
- Willis JC (1973) A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns. 8th edn (revised by Airy Shaw HK). Cambridge: Cambridge University Press.
- Winter K, Gademann R (1991) Daily changes in CO<sub>2</sub> and water vapour exchange, chlorophyll fluorescence and leaf water relations in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* during the induction of crassulacean acid metabolism in response to high salinity. Plant Physiol 95: 768-776.
- Winter K, Smith JAC (1996) Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution. Springer-Verlag, Berlin.
- Wyka TP, Lüttge U (2003) Contribution of C<sub>3</sub> carboxylation to the circadian rhythm of carbon dioxide uptake in a Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*. J Exp Bot 54:1471-1479.

## 7 ANHANG

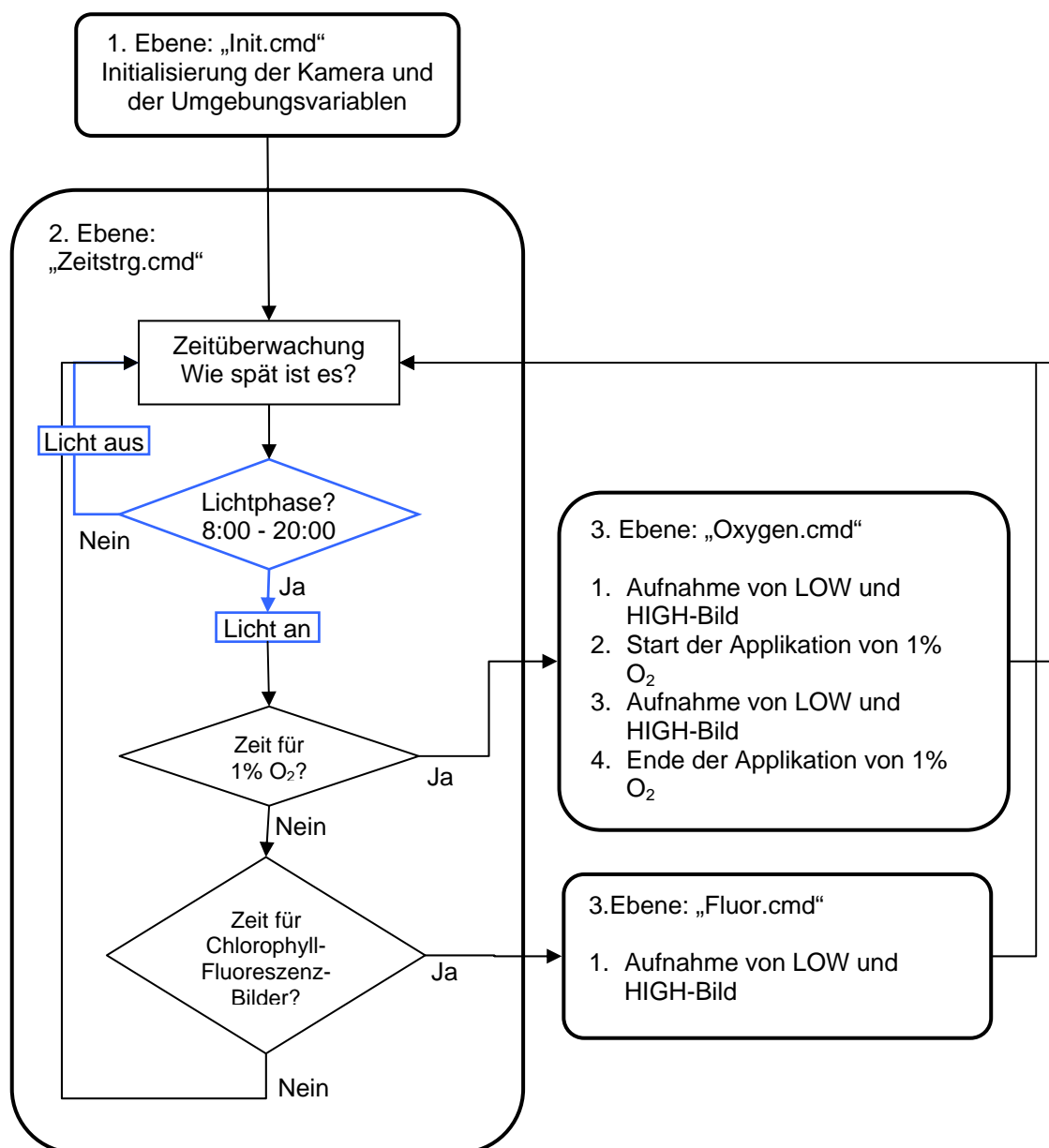
### 7.1 Quellcode der Steuerprogramme der Fluoreszenz-Kamera und des „Oxymats“

Für die Automatisierung der Applikation der Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub> und parallel dazu Aufnahmen von Chlorophyllfluoreszenzbildern wurde ein Programm für die Software PMIS (v.) geschrieben. Das Programm nutzt die Ressourcen der Makrosprache der Software für die Steuerung der Kamera AP-1, der Beleuchtungssysteme und der Ventile des „Oxymat“. Das Programm besteht aus vier Dateien des Typs „.cmd“ („Command“), die in unformatiertem Text (ASCII-Codierung) mit dem MS Windows Texteditor („Notepad.exe“) geschrieben wurden. Das Konzept der Programmierung enthält drei Ebenen. Das Wort Ebene wird hier verwandt, weil die Routinen in einer bestimmten Rangordnung organisiert sind, so dass eine Routine der Ebene 3 nicht ohne die Routine der Ebene 2 fungieren kann, aber die Routine der Ebene 2 kann mehrmals die Routine der Ebene 3 aufrufen. Ein Flussdiagramm wird in Abbildung 6.1 dargestellt.

Die erste Ebene besteht aus der Datei „Init.cmd“ und kümmert sich um die Initialisierung der Kamera, die Speicherzuordnung und das Fenster für die Visualisierung der Aufnahmen und die Vorbereitung der sogenannten „Umgebungsvariable“. Sie speichert Text und Werte, die für die Steuerung der Automatisierung wichtig sind, wie, z. B, die Belichtungszeit der LOW-Bilder und HIGH-Bilder. Am Ende ruft sie auch die Routine „Zeitstrg.cmd“ auf, die die zweite Ebene bildet. Hier wird die Uhr des Computers überwacht und geprüft, ob die vorprogrammierten Zeiten für die Applikation der Gasmischung und die Aufnahme der Chlorophyllfluoreszenz erreicht wurden. Diese Routine kann auch die Anschaltung und Ausschaltung der Beleuchtung zeitlich regeln, um einen Tag/Nacht Rhythmus zu produzieren. Für Dauerlichtversuche werden bestimmte Steuerungszeilen deaktiviert. Dafür muss man nur das Zeichen „\*“ vor jede Steuerungszeile tippen, und die Lampen schalten nicht



mehr aus, wenn das ganze Programm gestartet wird. Abhängig von der Vorprogrammierung von gewünschten Zeiten wird entweder die Routine „Fluor.cmd“ oder „Oxygen.cmd“ aufgerufen. Beide bilden die dritte Programmierungsebene.



**Abb. 6.1.** Flussdiagramm der Steuerungsroutine für die Fluoreszenz-Kamera mit dem „Oxymat“. Jeder Block besteht aus einem Dateityp „.cmd“ („Command“). Die blau gekennzeichneten Steuerungskomponenten werden während der Dauerlichtversuche deaktiviert.

Bei dem Aufrufen der Routine „Fluor.cmd“ werden die LOW- und HIGH-Bilder gemacht. Für beide Abbildungen wird zuerst eine Voraufnahme mit dunklen Feldern gemacht, d. h., der CCD-Chip wird mit geschlossener Blende belichtet. Das entstehende „Dark-Bild“ enthält eigentlich das Muster, das bei der thermischen Anregung auf dem CCD-Chip produziert wurde und wird aus der normalen Aufnahme von LOW- und HIGH-Bild abgezogen. Für das LOW-Bild erfolgt eine normale Belichtung mit der voreingestellten Belichtungszeit. Für das HIGH-Bild werden jedoch zuerst die Lampen 1000 ms aufgeblendet, und danach wird der CCD-Chip belichtet. Die Lampen können dann zurück zu der vorherigen Lichtintensität abgeblendet werden. Die Bilder werden nach der Aufnahme und „Dark-Korrektur“ auf der Festplatte gesichert. Der ganze Prozess dauert nicht mehr als 7 Sekunden.

Die Routine „Oxygen.cmd“ wiederholt zuerst die gleiche Prozedur der Routine „Fluor.cmd“ und macht die Aufnahme von LOW- und HIGH-Bild. Danach werden die Ventile des „Oxymat“ für die Applikation der Gasmischung mit 1% O<sub>2</sub> gesteuert. Nach 20 Minuten, werden LOW- und HIGH-Bild wieder aufgenommen und die Ventile des „Oxymat“ zurückgestellt.

### 7.1.1 Initialisierung der Fluoreszenz-Kamera („Init.cmd“)

\* Makro Ebene 1: Initialisierung der Kamera

```
CAMINIT C:\PMIS\AP1-14.INI      ;* Geräteeinstellungen für die AP1 14bit Kamera
CAMTEMP SET -10                 ;* Temperatur des CCD Chips
```

\* Vorbereitung der Benutzerschnittstelle

```
ICREATE "LOW" 768 512           ;* Speicherraum und Fenster für das LOW-Bild
ci "LOW"
WINDOW Image display
ICREATE "HIGH" 768 512          ;* Speicherraum und Fenster für das HIGH-Bild
ci "HIGH"
WINDOW Image display
ICREATE "Dark" 768 512          ;* Speicherraum für das Dark-Bild
ci "Dark"
WINDOW Image display
```

\* Initialisierung von Variablen

```
VDEFINE GM 8                    ;* Zeit des Beginns der Lichtphase (8:00 Uhr)
VDEFINE GN 20                   ;* Zeit des Endes der Lichtphase (20:00 Uhr)
```

```

VDEFINE HH 0           ; * Stunde
VDEFINE MM 0           ; * Minute
VDEFINE count 1        ; * Zähler der Bilder
VDEFINE TMP 1          ; * Zeit der Synchronisierung
VDEFINE DAY 1          ; * Tag
VDEFINE DT ""          ; * Datum
VDEFINE low_obs 70      ; * Verschlusszeit für LOW-Bild
VDEFINE high_obs 35     ; * Verschlusszeit für HIGH-Bild
VDEFINE flash 1200      ; * Dauer des sättigenden Lichtblitzes
VDEFINE oxtm 20         ; * Dauer der Applikation der Gasmischung mit 1% O2 (min)
VDEFINE oxtms 0         ; * Steuerungsvariable
VDEFINE F_exist 1      ; * Für Dateiüberprüfung

```

\* Kopfzeile für der Protokol

```

FILE Exist "d:\bilder\prot.txt"
VDEFINE F_exist lvalue
IF @F_exist==0
  OPEN O "d:\bilder\prot.txt" W
  WRITE O "Versuch: Clusia minor 8, Heitor Duarte"
  WRITE O "First CAM induction 25/25°C, TP 14.6°C, Dry stress"
  WRITE O "Anfang: 22.11.00, LI 170"
  WRITE O "Kamera, Verschlusszeit 70/35ms, Blende 4"
  CLOSE O
ENDIF

```

\* Ruf die Routine Zeitstrg.cmd auf  
!Zeitstrg.cmd

## 7.1.2 Zeitsteuerung für die Fluoreszenz Kamera und den „Oxymat“

\* Makro Ebene 2: Zeitsteuerung für die Fluoreszenz Kamera und den Oxymat

```

LOOP                      ; * Start der Schleife

```

\* Zeit Beobachtung - "Wie spät ist es?"

```

TIME -q
VDEFINE TM tvalue
STRING extract 10 2 @TM
VDEFINE HH tvalue
STRING extract 13 2 @TM
VDEFINE MM tvalue

```

\* Lichtphase? - Die Routine wird in Dauerlichtversuchen deaktiviert.

```

IF @HH >= @GM && @HH < @GN      ; * Ist Zeit zwischen 8:00 bis 20:00?
  TTLOUT 253                    ; * Ja! Licht an! Mach folgendes!

```

\* 1% O2? Wann? - Zeitüberprüfung für Anwendung der Gasmischung zusammen

\* mit Aufnahmen der Chlorophyllfluoreszenz.

\* Für Messungen im Tag/Nacht Rhythmus - Wird in Dauerlichtversuchen deaktiviert

```

IF (@HH==8 && @MM==30) || (@HH==11 && @MM==10) || (@HH==14 && @MM==10) ||
  (@HH==17 && @MM==10) || (@HH==19 && @MM==10)

```

```

!Oxygen.cmd                                ;* Ist Zeit für 1%O2? Ja! Start die Routine „Oxygen.cmd“
ENDIF

* Zeitüberprüfung für die Anwendung der Gasmischung zusammen mit der Aufnahme der
* Chlorophyllfluoreszenz im Dauerlicht. Die Routine wird im Tag/Nacht Rhythmus deaktiviert.
* Als Beispiel wurde die Routine für Dauerlicht hier mit dem Zeichen „*“ deaktiviert.

* IF (@HH==0 && @MM==30) || (@HH==3 && @MM==30) || (@HH==6 && @MM==30) ||
*   (@HH==9 && @MM==30) || (@HH==12 && @MM==30) || (@HH==15 && @MM==30) ||
*   (@HH==18 && @MM==30) || (@HH==21 && @MM==30)
*   !Oxygen.cmd                                ;* Ist Zeit für 1% O2? Ja! Start die Routine „Oxygen.cmd“
* ENDIF

* Zeitüberprüfung für die Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenz ohne Anwendung der Gasmischung

IF @MM==10||@MM==30||@MM==50                ;* Alle 20 Minuten (Minute 10, 30 oder 50)
!Fluor.cmd                                ;* Ist 10, 30 oder 50? Ja! Ruf die Routine „Fluor.cmd“
ENDIF

ELSE                                          ;* Ist Zeit zwischen 8:00 bis 20:00?
TTLOUT 255                                ;* Nein! Licht aus!
ENDIF

ENDLOOP                                    ;* Ende der Schleife

```

### 7.1.3 Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern unter 1% O<sub>2</sub>

\* Makro Ebene 3: Applikation der Gasmischung zusammen mit der Aufnahme der  
 \* Chlorophyllfluoreszenz.

\* 1. Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern kurz vor dem Start der Applikation von 1% O<sub>2</sub>

```

CCLEAR OFF
FLAG CRITICAL ON

CI "dark"                                ;* Aufnahme von LOW-Bild
Dark @low_obs
CI "low"
OBS @low_obs
I- "Dark"

CI "Dark"                                ;* Aufnahme von HIGH-Bild
Dark @high_obs
CI "high"
TTLOUT 249                                ;* Lampen werden aufgeblendet.
DELAY @flash
OBS @high_obs
TTLOUT 253                                ;* Lampen werden abgeblendet.
I- "Dark"

FLAG CRITICAL OFF
CCLEAR ON

OPEN 0 "d:\bilder\prot.txt" A              ;* Die Aufnahmen werden protokolliert.
PRINT -r @count
WRITE 0 @count\t@TM\t"21% Oxygen"
CLOSE 0
VDEFINE count @count+1

```

\* 2. Start der Applikation von Luft mit 1% O<sub>2</sub>

```

TTLOUT 245           ;* Aktiviert das Ventil 1
DELAY 10000          ;* Gasmischung mit 1% O2 fließ 10 s durch das Puffergefäß
TTLOUT 229           ;* Aktiviert das Ventil 2 und Gasmischung fließt durch das
                    ;* Miniküvettenystem

Print "Under 1% Oxygen"           ;* Wartezeit der Applikation von 1% O2,
VDEFINE oxtms @oxtm*6000          ;* normalerweise 20 Minuten
TIME -q Begin
TIME Wait @oxtms
TIME End

```

\* 3. Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern kurz vor dem Ende der Applikation von 1% O<sub>2</sub>

```

CCLEAR OFF
FLAG CRITICAL ON

CI "dark"             ;* Aufnahme von LOW-Bild
Dark @low_obs
CI "low"
OBS @low_obs
I- "Dark"

CI "Dark"             ;* Aufnahme von HIGH-Bild
Dark @high_obs
CI "high"
WINDOW Image display

TTLOUT 225            ;* Lampen werden aufgeblendet.
DELAY @flash
OBS @high_obs
TTLOUT 229            ;* Lampen werden abgeblendet.
I- "Dark"

FLAG CRITICAL OFF
CCLEAR ON

```

4. Ende der Applikation von 1% O<sub>2</sub>

```

TTLOUT 245           ;* Deaktiviert Ventil 2
DELAY 3000           ;* Wartezeit von 3 Sekunden
TTLOUT 253           ;* Deaktiviert Ventil 1

OPEN 0 "d:\bilder\prot.txt" A           ;* Die Aufnahmen werden protokolliert.
PRINT -r @count
WRITE 0 @count\t@TM\t"21% Oxygen"
CLOSE 0
VDEFINE count @count+1

```

## \* Schleife für Zeitsynchronisierung

```

LOOP
  TIME -q
  VDEFINE TM tvalue
  STRING extract 13 2 @TM
  VDEFINE MM TVALUE
  IF @MM==32||@MM==52
    EXITLOOP
  ENDIF
ENDLOOP

```

## 7.1.4 Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern unter normaler Luft

\* 1. Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzbildern

CCLEAR OFF  
FLAG CRITICAL on

```
CI "dark" ;* Aufnahme von LOW-Bild
Dark @low_obs
CI "low"
WINDOW Image display
OBS @low_obs
I- "Dark"
ISAVE d:\bilder\low@count
```

```
CI "Dark" ;* Aufnahme von HIGH-Bild
Dark @high_obs
CI "high"
WINDOW Image display
TTLOUT 249 ;* Lampen werden aufgeblendet
DELAY @flash
OBS @high_obs
TTLOUT 253 ;* Lampen werden abgeblendet.
I- "Dark"
ISAVE d:\bilder\high@count
```

FLAG CRITICAL OFF  
CCLEAR ON

```
OPEN O "d:\bilder\prot.txt" A ;* Die Aufnahmen werden protokolliert.
PRINT @count
WRITE O @count\t@TM\t"21% Oxygen"
CLOSE O
```

\* Schleife für Zeitsynchronisierung

```
LOOP
TIME -q
VDEFINE TM tvalue
STRING extract 13 2 @TM
VDEFINE MM TVALUE
IF @MM==11||@MM==31||@MM==51
EXITLOOP
ENDIF
ENDLOOP
VDEFINE count @count+1
```

## 7.1.5 Quellcode zur Berechnung der relativen Quanteneffizienz

\* Die Notwendige Information werden gefragt

```
FLAG E OFF
SYSGET text "Nummer des ersten Bild" "12" ;* Nummer des ersten Bildes. Z.B.,12.
VDEFINE erstes_bild @tvalue
SYSGET text " Nummer des letzten Bild" "47" ;* Nummer des letzten Bildes. Z.B., 47.
VDEFINE leztes_bild @tvalue
VDEFINE loop @lezte_bild-@erste_bild+1 ;* Zahlen von Messungen werden gerechnet.
```

```

VDEFINE count @erstes_bild
; * Z.B., 12 bis 47 sind insgesamt 36 Messungen
; * Bildzähler wird für das erste Bild aktualisiert

SYSGET text "Quelle" "D:\Clusia10\LowHigh\"
; * Pfadquelle für LOW- und HIGH-Bild
VDEFINE pathq @tvalue
SYSGET text "Ziel" " D:\Clusia10\Yield\"
; * Pfadziel für „YIELD-Bild“
VDEFINE pathz @tvalue
SYSSET N @pathq

IREMOVE *
ICREATE "yield" 768 512
; * Speicherraum für das YIELD-Bild wird reserviert
FLAG CRITICAL on
; * Prozessor hat höhere Priorität
PRIORITY 3

* Schleife: Der Algorithmus für die Rechnung der relative Quanteneffizienz (YIELD-Bild) wird für die
* Nummer von Messungen wiederholt. Z.B. 36 Mal.

LOOP @loop
; * Beginn der Schleife.
  IOPEN low@count "low"
; * Dateien LOW#.pmi und HIGH#.pmi werden geöffnet
  IOPEN high@count "high"
; * Z.B. LOW12.pmi und HIGH12.pmi

  CI "yield"
; * (HIGH - LOW) / HIGH wird gerechnet und auf 10000
  I= "high"
; * Grauwerte skaliert.
  I= "low"
  I/ "high" 10000
  ISAVE @pathz\y@count
; * Gerechnete Abbildung wird als Y#.pmi auf der Festplatte
; * gespeichert, z.B., Y12.pmi
; * Dateien LOW#.pmi und HIGH#.pmi werden geschlossen

  IREMOVE "low"
  IREMOVE "high"
  PRINT @count
; * Nummer des YIELD-Bild wird auf dem Bildschirm
; * gezeigt, Z.B., 12.

  PRINT
  VDEFINE count @count+1
; * Zähler wird für die nächste Abbildung aktualisiert
; * Geht zu der nächsten Messung, z.B., #13
ENDLOOP

FLAG CRITICAL off
PRIORITY 1

```

## 8 LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

Name: Monteiro Duarte  
 Vorname: Heitor  
 Geburtsdatum: 19.02.1971  
 Geburtsort: Goiânia - GO, Brasilien  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: brasilianisch



### Schulbildung

1978 - 1986 Grundschole *Colégio Agostiniano N.S. Fátima* Goiânia GO, Brasilien.  
 1987 - 1989 Gymnasium *Colégio Marista São José* Rio de Janeiro - RJ, Brasilien.

### Studium

Febr. 1990 - Aug. 1995 Studium der Biologie, Schwerpunkt Ökologie, an der *Universidade Federal do Rio de Janeiro*.  
 Mär. 1996 - Mär 1998 *Master of Sciences* in Ökologie. *Universidade Federal do Rio de Janeiro* bei Prof. Dr. Fábio Rubio Scarano.  
 Apr. 1999 - Dez. 2005 Promotionsarbeit an der Technischen Universität Darmstadt bei Prof. Dr. Ulrich Lüttge.

### Stipendien

Aug. 1991 - Mär. 1992 Stipendiat der *Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Projekt: „Anatomie des Blattes von *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl und *Deschampsia antarctica* Desv. beide aus Antarktis.“  
 Aug. 1995 - Mär. 1996 Stipendiat der Forschungsstiftung der Bundesstadt von Rio de Janeiro. *Pre Master of Science*. „Untersuchung der Anatomie von epidermalen Zellen in Blättern von Pflanzenarten des Bundesstaats Rio de Janeiro.“  
 Mär. 1996 - Mär. 1998 *Master of Science* Stipendium an der *Universidade Federal do Rio de Janeiro*.  
 Okt. 1998 - 2003 Stipendiat des Deutschen Akademische Austauschdienstes (DAAD); Promotionsarbeit an der Technische Universität Darmstadt.



## Berufliche Tätigkeiten

- Aug. - Dez. 2000      Studentische Hilfskraft mit Abschluss in Rahmen des Sonderforschungsbereiches 199 an der Technischen Universität Darmstadt.
- Mär. 2002 - Mär. 2005      Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Lüttge.

## Lehrtätigkeiten

- Aug. 1996      Dozententätigkeit an *Universidade Federal do Rio de Janeiro* zum Thema „Pflanzen Epidermis, Struktur und Funktion“ und „Anatomie des Blattes und deren ökologische Betrachtungen.“
- Okt. 1996, Apr. 1997      Dozententätigkeit an der *Faculdade de Ciências Agro-ambientais - Rio de Janeiro*: „Blatt Epidermis - Ontogenese und Funktion“ und „Epidermis und Peridermis“.
- 1999 - 2004      Maßgebliche Mitarbeit bei der Durchführung des dreiwöchigen Fortgeschrittenen - Praktikums „Ökophysiologie der Photosynthese“ an der Technischen Universität Darmstadt.
- 2002 - 2004      Organisation und Durchführung des „physiologischen Grundpraktikums“. Versuchen: „Pigmente: Isolierung - Chromatographie - Absorption - Fluoreszenz“ in Sommer Semester. 96 Stunden

## Publikationsliste

- Ramos MFS, Santos EP, Bizarri CHB, Mattos HA, Padilha MRS, **Duarte HM** (1996) „Preliminary studies towards utilisation of various plant extracts as antisolar agents“. *International Journal of Cosmetic Science* 18: 87-101
- Scarano F R, **Duarte, HM**, Ribeiro KT, Rodrigues PJFP, Barcelos EMB, Franco AC, Brulfert J, Deléens E, Lüttge U „Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geografic distribution to ecophysiological parameters“. *Botanical Journal of the Linnean Society*, (2001)136: 345-364.
- Scarano FR, **Duarte HM**, Rôças G, Barreto SMB, Amado EF, Reinert F, Wendt T, Mantovani A, Lima HRP, Barros CF (2002) Acclimation or stress symptom? An integrated study of intraspecific variation in the clonal plant *Aechmea bromeliifolia*, a widespread CAM tank-bromeliad. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140: 391-401
- Scarano FR, Cirne P, Rôças G, **Duarte HM** & Barros CF (2002) Variação fenotípica em plantas sob distintos extremos ambientais na restinga de Jacarepiá: aclimação vs. estresse. In: Sá CFC & Araujo DSD (eds.). *Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá: Estudos Botânicos em uma Restinga Fluminense. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.*
- Fernandes GW, **Duarte, HM**, Lüttge, U (2003) Hypersensitivity of *Fagus sylvatica* L. against leaf galling insects. *Trees* 17: 407-411.

- Berg A, Orthen B, de Mattos EA, **Duarte HM**, Lüttge U (2004) Expression of Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia hilariana* SCHLTDL. in different stages of development in the field. *Trees* 18:553-558.
- Wyka T, Bohn A, **Duarte HM**, Keiser F, Lüttge U (2004) "Perturbations of malate accumulation and the endogenous rhythms of gas exchange in the Crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana*: testing the tonoplast as oscillator model": *Planta* 219: 705-713.
- Duarte HM**, Jakovljevic I, Keiser F, Lüttge U. (2005) Lateral diffusion of CO<sub>2</sub> and signalling in leaves of the crassulacean acid metabolism (CAM) plant *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier. *Planta* 220: 809-816
- Wyka TP, **Duarte HM**, Lüttge U (2005) Redundancy of stomatal control for the circadian photosynthetic Rhythm in *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier. *Plant Biology* 7:176-181
- Scarano FR, **Duarte HM**, Franco AC, Geßler A, de Mattos EA, Rennenberg H, Lüttge U (2005) Physiological synecology of tree species in relation to geographic distribution and ecophysiological parameters at the Atlantic forest periphery in Brazil: an overview. *Trees* 19:493-496
- Geßler A, **Duarte HM**, Franco AC, Lüttge U, de Mattos EA, Nahm M, Scarano FR, Zaluvar HLT, Rennenberg H (2005) Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE-Brazil. II. Spatial and ontogenetic dynamics in deciduous *Andira legalis*. *Trees* 19: 510-522
- Geßler A, **Duarte HM**, Franco AC, Lüttge U, de Mattos EA, Nahm M, Rodrigues PJFP, Scarano FR, Rennenberg H (2005) Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic Forest of SE – Brazil III. Three legume trees in a semideciduous dry forest. *Trees* 19: 523-530
- Duarte HM**, Geßler A, Scarano FR, Franco AC, de Mattos EA, Nahm M., Rennenberg H, Rodrigues PJFP, Zaluvar HLT, Lüttge U (2005) Ecophysiology of six selected shrub species in different plant communities at periphery of the Atlantic Forest of SE-Brazil. *Flora* 200:456-476

### Vorträge und Posterpräsentationen

- |           |   |
|-----------|---|
| Jan. 1995 | Poster: „Light Regime Affecting Root Carbohydrate Storage and Importance Value of Saplings in an Amazonian Seasonally Flooded Forest". XLVI, Ribeirão Preto/SP Brasilien.   |
| Aug. 1995 | Poster: "Light Regime Affecting Root Carbohydrate Storage and Importance Value of Saplings in an Amazonian Seasonally Flooded Forest". Symposium der Internationalen Gesellschaft für Pflanze Anaerobiose, Lammi Biological Station, Finland. |

- 
- Okt. 1996                      Poster: „*Vegetal Covering and Clump Distribution in the Brazilian Sand Coastal Plains (Restingas of Clusias, Massambaba, Arraial do Cabo, RJ)*“. III Brasilianische Kongress für Ökologie, Brasilia.
- Jul. 1996                      Vortrag: "Leaf Anatomical Responses of *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Backer under Distinct Light and Flooding Regimes". XLVII Brasilianische Kongress für Botanik, Nova Friburgo, RJ, Brasilien.
- Mai 2001                      Vortrag: „Endogener Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz- Rhythmus bei *Clusia minor* L. in C<sub>3</sub>- und CAM-Zustand“. Symposium anlässlich der Ehrepromotion von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. O. L. Lange. Physiologische Ökologie und ökosystemare Bedeutung. Darmstadt.
- Feb. 2002                      Vortrag Präsentation: „Horizontal Diffusion of CO<sub>2</sub> Inside the Leaf as Factor Synchronising Individual Cell Oscillators in the CAM Plant *Kalanchoë daigremontiana*“, Rein-Main Kolloquium, Universität Heidelberg.
- Sep. 2002                      Vortrag Präsentation: „Imaging by a New Portable High Resolution Chlorophyll-Fluorescence Camera“. Sommer Scholl, GRK 340, Kleinwalsertal, Hirschegg, Österreich.
- Mar. 2003                      Poster Präsentation: "Chronobiology of *Clusia minor*: Circadian Oscillations in C<sub>3</sub>/CAM Intermediate Photosynthetic Behaviour„ 54. Mosbacher Kolloquium "The Rhythm of Life: Molecular Mechanisms of Circadian Clocks".
- Sep. 2003                      Vortrag Präsentation: „ Chronobiology of *Clusia minor*: Circadian - Oscillations in C<sub>3</sub>/CAM Intermediate Photosynthetic Behavior ". Sommer School, GRK 340, Kleinwalsertal, Hirschegg, Österreich.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe. Ich habe noch keinen Promotionsversuch unternommen.

A handwritten signature in black ink, reading "Heitor Monteiro Duarte". The script is cursive and fluid.

Heitor Monteiro Duarte

Darmstadt, Dezember 2005.